

**Estudio farmacogenético de variantes polimórficas en genes reparadores del ADN y otros marcadores de resistencia en pacientes con cancer de cabeza y cuello**



**Goretti Durán Piñeiro**

**Tesis doctoral**

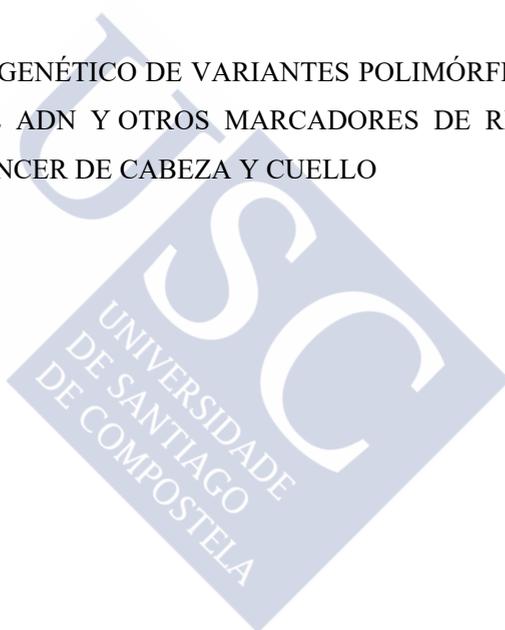
**Santiago de Compostela, 2015**





FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA  
Y CIENCIAS FORENSES

ESTUDIO FARMACOGENÉTICO DE VARIANTES POLIMÓRFICAS EN GENES  
REPARADORES DEL ADN Y OTROS MARCADORES DE RESISTENCIA EN  
PACIENTES CON CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO



Memoria para optar al grado de Doctor

presentada por:

Goretti Durán Piñeiro

Santiago de Compostela, 2015



El Profesor Doctor Ángel Carracedo Álvarez, Catedrático de Medicina Legal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, la Doctora María Jesús Lamas Díaz, doctora en Farmacia, Jefa de Servicio de Farmacia del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela y del Grupo de Farmacología Clínica del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela, y el Doctor Rafael López López profesor asociado de ciencias de la salud, en el departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, Jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “Estudio farmacogenético de variantes polimórficas en genes reparadores del ADN y otros marcadores de resistencia en pacientes con cáncer de cabeza y cuello” se ha realizado bajo su dirección por la licenciada en Farmacia Goretti Durán Piñeiro y se encuentra en condiciones de presentarse y defenderse como tesis doctoral ante el tribunal correspondiente en la Universidad de Santiago de Compostela.

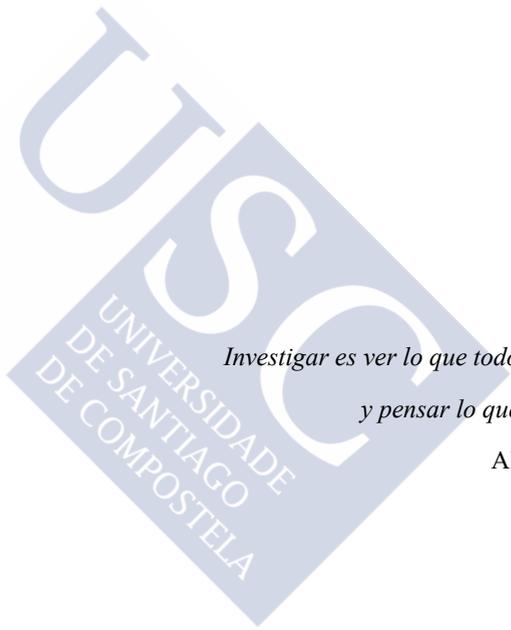
Para que así conste, se expide el presente certificado en Santiago de Compostela a 12 de Noviembre de 2015.

Dra. María Jesús Lamas

Prof Dr. Ángel Carracedo

Dr. Rafael López





*Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto  
y pensar lo que nadie ha pensado*

Albert Szent-György





**"Lo esencial es invisible a los ojos"**  
**El Principito**



## **Agradecimientos**

En primer lugar, quisiera expresar mis agradecimientos a mis directores de tesis por haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos en este proyecto, sin sus apoyos, confianza, disponibilidad y conocimientos, difícilmente este proyecto habría prosperado.

También, quiero agradecer a todas las personas que de una forma u otra han posibilitado que este trabajo se llevara a cabo, en especial a Pancho, que ya desde el DEA su aportación y conocimientos me han ayudado en todo a lo referente a la farmacogenética, a Raquel y Laura, por sus innumerables horas dedicadas al procesado de datos, a Mily y al personal del CeGen por sus horas de laboratorio en el análisis de las muestras y a Yago por poner tanta ilusión en este proyecto y ayudarme en todo momento con la inclusión de los pacientes en el estudio.

A todo el Servicio de Oncología Médica, Oncología Radioterápica y en especial a la UFO, por hacerme sentir desde el primer día como un miembro más de este equipo, he vivido los mejores años de mi vida profesional con todos vosotros y remontadas inolvidables.

A los pacientes, por su generosidad infinita, sin ellos nada de esto hubiera sido posible.

A mis padres, por todo su esfuerzo y apoyo en todos mis sueños, que también son suyos.

A mis amigos por acompañarme en todo momento en esta travesía con tantos altos y bajos.

A Chema, pieza clave en mi vida, por tu paciencia infinita y apoyo incondicional.



## Resumen/Abstract

El cáncer escamoso de cabeza y cuello (CECC) tiene una gran complejidad anatómica y funcional, constituye un grupo heterogéneo de tumores que engloba diversas estructuras anatómicas, la cavidad oral, nasofaringe, orofaringe, laringe e hipofaringe, y es la séptima neoplasia con mayor incidencia en la población mundial.

Nuestro objetivo fue evaluar la asociación entre SNPs implicados en la vía del platino/radiación con la respuesta, supervivencia y toxicidad en pacientes con CECC localmente avanzado que recibieron quimiorradioterapia concomitante basada en platino.

Para seleccionar los genes y SNPs candidatos se hizo una búsqueda bibliográfica de la literatura en la base de datos MEDLINE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>) hasta enero de 2011 utilizando descriptores. Se analizó un panel de marcadores farmacogenéticos con 36 SNPs, para estudiar la asociación con la tasa de respuesta, supervivencia y toxicidades en pacientes de CECC localmente avanzado.

Se realizó un estudio prospectivo en 110 pacientes, (edad media 58,6 años, 89% hombres), a cada paciente se le extrajo sangre periférica para la extraer el ADN y los SNPs fueron analizados mediante la tecnología MassARRAY® iPLEX Gold (Sequenom®)

Nuestros resultados sugieren que los polimorfismos en los genes ABCB1 C3435T y ERCC2 (Asp312Asn, Arg132Arg y Lys751Gln) pueden ser marcadores predictivos de respuesta a la quimiorradioterapia basada en platino. Alelos variantes de MMP2 y ABCC2 se asociaron con una mejor supervivencia libre de progresión. La interacción gen-gen y análisis de haplotipos mostró más información acerca de la tasa de respuesta al tratamiento que el análisis individual. No se encontraron asociaciones con polimorfismos implicados en la vía de reparación por escisión de bases. Varios SNPs individuales que participan en el flujo/eflujo de fármacos, el metabolismo, la detoxicación y la reparación de los daños del ADN sugieren mayor riesgo de toxicidad.

El número de pacientes en el estudio fue relativamente bajo y ninguno de los SNPs analizados superó la corrección de Bonferroni, lo que no nos permite sacar conclusiones firmes. La inclusión de los estudios farmacogenéticos en los ensayos de cáncer de cabeza y cuello podrían ayudar a personalizar el tratamiento y optimizar la evolución del paciente.

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) arises in the oral cavity, nasopharynx, oropharynx, larynx and hypopharynx, and is the seventh leading cancer by incidence worldwide.

Our objective was to evaluate the association between SNPs in radiation/platinum pathways with response, survival and toxicity in subjects with locally advanced HNSCC who received platinum-based chemoradiotherapy.

We performed a search in the MEDLINE embase (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>) until January 01,2011 using the following key words to select our candidate genes. We included in the review mechanisms of chemoresistance involved in drug influx and efflux, metabolism and detoxification, DNA damage repair and other downstream cellular processes that modulate the effect of platinum-based chemoradiotherapy. We studied the association of a panel of pharmacogenetic markers (36 single nucleotide polymorphisms) with response rate, survival and toxicity in locally advanced HNSCC in patients treated with chemoradiotherapy. This prospective study included 110 patients (median age 58,6 years, 89% men), DNA was extracted from peripheral blood samples and genotyped by MassARRAY® iPLEX Gold (Sequenom®).

Our results suggested that gene polymorphisms in ABCB1 C3435T and ERCC2 (Asp312Asn, Arg132Arg and Lys751Gln) may be a predictive marker of platinum-based chemoradiotherapy response. Variant alleles of MMP2 and ABCC2 were associated with significantly improved progression-free survival. Gene-gene interaction and haplotypes analysis showed more information about response rate to treatment than individual analysis. No associations with Base Excision Repair polymorphism were found. SNPs involved in drug influx and efflux, metabolism, detoxification and DNA damage repair were associated with toxicity.

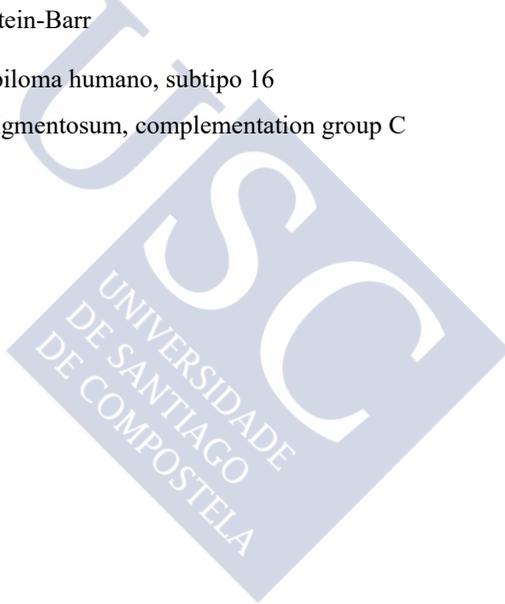
The number of patients in our study was relatively low, none SNP passed a Bonferroni-corrected and does not allow us to draw firm conclusions. The inclusion of pharmacogenetic studies in head and neck cancer trials could help to personalize treatment and optimize patient outcome.

## Lista de abreviaturas

AJCC	American Joint Committee on Cancer
BER	Base Excision Repair
CCC	Carcinomas de cabeza y cuello
CDDP	Cisplatino
CECC	Carcinoma escamoso de cabeza y cuello
CeGen	Centro Nacional de Genotipado
CL	Control locoregional
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
CTR1	Proteína transportadora de cobre 1
CTV	Clinical target volumen
dNTP	Dinucleótidos trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EUROCORE	European cancer registry based study on survival and care of cancer patients
FPGMX	Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica
GSTs	Glutación S-transferasas
GTV	Gross tumor volumen
HR	Homologous repair
IMRT	Técnica de radioterapia con intensidad modulada
M	Metástasis a distancia
MALDI-TOF	Matrix-assisted láser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
MDR	Proteínas de multirresistencia
MMR	Missmatch repair
N	Adenopatías regionales
NER	Nucleotide Excision Repair
NHEJ	Non Homologous End Joining
°C	Grados centígrados
OCTs	transportadores de cationes orgánicos
PTV	Planning target volumen
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors

## ABREVIATURAS

RPA	Proteína de replicación A
RQT	Radioquimioterapia
RT	Radioterapia
SG	Supervivencia global
SLE	Supervivencia libre de enfermedad
SNPs	Polimorfismos de un único nucleótido
T	Tumor primario
TC	Tomografía computerizada
TFIIH	Transcription factor II Human
TNM	Tumor, Node Metastasis
VEB	Virus de Epstein-Barr
VPH-16	Virus del papiloma humano, subtipo 16
XPC	xeroderma pigmentosum, complementation group C
μL	Microlitros
μM	Micromolar



## Índice de tablas

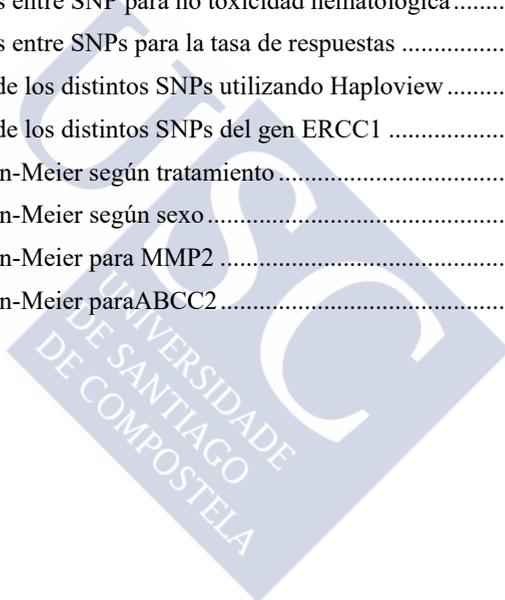
Tabla 1: Muestra la tasa estimada de la incidencia y mortalidad por sexo y localización .....	29
Tabla 2: Diferencias entre tumores de cabeza y cuello VPH positivo y negativo .....	32
Tabla 3: Factores de riesgo del CCC.....	33
Tabla 4: Variantes del carcinoma escamoso .....	42
Tabla 5: Principales factores pronósticos del CCC.....	46
Tabla 6: Principales estudios en CECC localmente avanzado .....	59
Tabla 7: Toxicidades recogidas en el estudio según las CTCAE v4.0.....	87
Tabla 8: Criterios RECIST v1.1 .....	88
Tabla 9: Selección de genes candidatos .....	96
Tabla 10: Cocktail PCR multiplex sin ADN.....	102
Tabla 11: Cocktail reacción iPLEX.....	103
Tabla 12: Variaciones en masa de los ddNTPs para SBE-Sequenom MassARRAY® System. ...	104
Tabla 13: Respuestas según criterios RECIST .....	115
Tabla 14: Peor grado de toxicidad en cualquier ciclo de tratamiento .....	115
Tabla 15: Presencia de disfagia a lo largo del tratamiento radical .....	116
Tabla 16: Frecuencia de recidivas tras tratamiento radical.....	116
Tabla 17: Grados de toxicidad en cualquier ciclo de tratamiento .....	117
Tabla 18: Presencia de disfagia a lo largo del tratamiento adyuvante .....	117
Tabla 19: Frecuencia de recidivas tras tratamiento adyuvante.....	118
Tabla 20: Distribución de los polimorfismos en nuestra población .....	118
Tabla 21: SNPs que mostraron asociación significativa con toxicidad hematológica.....	121
Tabla 22: SNPs que mostraron asociación significativa con toxicidad no hematológica .....	122
Tabla 23: Análisis de las variantes genéticas y su asociación con toxicidades graves.....	124
Tabla 24: Análisis de las variantes genéticas y su asociación con la tasa de respuestas .....	127
Tabla 25: Regresión logística múltiple con selección de variables para disfagia .....	128
Tabla 26: Regresión logística múltiple con selección de variables para toxicidad hematológica.....	129
Tabla 27: Regresión logística múltiple con selección de variables para el tamaño tumoral ...	129
Tabla 28: Regresión logística múltiple de las interacciones entre FGFR4 y ERCC4 .....	133
Tabla 29: Regresión logística múltiple de las interacciones entre ATP7B y ERCC4 .....	133
Tabla 30: Combinaciones con mayor significación en el análisis MDR .....	134
Tabla 31: Relación de SNPs de ERCC1 y toxicidad en pacientes a tratamiento con platino .....	164

## Índice de figuras

Fig 1: Esquema de carcinogénesis relacionada con el tabaco y el alcohol y mecanismos de defensa anticarcinogénicos.....	30
Fig 2: Histología de las diferentes etapas. Modelo de progresión en CCC.....	34
Fig 3: Presentación de los eventos genéticos y epigenéticos que determinan la progresión en la carcinogénesis del CCC. ....	35
Fig 4: Proceso de cancerización de campo y los tipos de recaída.....	37
Fig 5: Regiones en el cáncer de cabeza y cuello. ....	39
Fig 6: Esquema que muestra los niveles y subniveles ganglionares del cuello . ....	39
Fig 7: Número de ganglios linfáticos cervicales positivos como predictores de metástasis a distancia y SG a 5 años.....	51
Fig 8: Comparación de las distribuciones de dosis según las diferentes técnicas de radioterapia. ....	55
Fig 9: Vías moleculares de señalización y nuevos agentes para el tratamiento del CECC ....	60
Fig 10: Ruta metabólica del cisplatino.....	62
Fig 11: Esquema del mecanismo de reparación NER.....	64
Fig 12: Esquema del mecanismo de reparación BER.....	66
Fig 13: Esquema del mecanismo de reparación de errores MMR.....	67
Fig 14: Esquema del mecanismo de reparación de roturas por HR.....	69
Fig 15: Esquema del mecanismo de reparación de roturas por NHEJ.....	70
Fig 16: Diagrama esquemático del transporte de cisplatino (CP).....	71
Fig 17: Mecanismo de detoxificación del platino. Imagen de Yang y cols.....	73
Fig 18: Delimitación de volúmenes de tratamiento con la técnica 3D.....	91
Fig 19: Principios metodológicos de iPLEX.....	101
Fig 20: Análisis de la combinación formada por los SNPs rs1061472 y rs13181.....	134
Fig 21: El análisis de descomposición de la entropía.....	135
Fig 22: Región del cromosoma 19 donde se localizan los polimorfismos seleccionados....	136
Fig 23: Forest plot del meta-análisis realizado al SNP rs1799793 (Asp312Asn) y la tasa de respuestas en pacientes tratados con platino.....	151
Fig 24: Forest plot del reciente meta-análisis realizado al SNP rs1045642 (C3435T) y la tasa de respuestas a la terapia basada en platino en individuos caucásicos. ....	155

## Índice de gráficos

Gráfico 1:	Estimaciones mundiales de incidencia y mortalidad por cáncer.....	27
Gráfico 2:	Relación de pacientes con el consumo de tabaco y alcohol.....	111
Gráfico 3:	Distribución de la localización de las lesiones.....	112
Gráfico 4:	Distribución de los pacientes según la afectación de los ganglios.....	112
Gráfico 5:	Grado de diferenciación .....	113
Gráfico 6:	Dosis de Platino.....	113
Gráfico 7:	Dosis de radioterapia (Gy) .....	114
Gráfico 8:	Interacciones entre SNP para toxicidad hematológica .....	130
Gráfico 9:	Interacciones entre SNP para no toxicidad hematológica .....	131
Gráfico 10:	Interacciones entre SNPs para la tasa de respuestas .....	132
Gráfico 11:	Ligamiento de los distintos SNPs utilizando Haploview .....	136
Gráfico 12:	Ligamiento de los distintos SNPs del gen ERCC1 .....	137
Gráfico 13:	Curva Klapan-Meier según tratamiento .....	138
Gráfico 14:	Curva Klapan-Meier según sexo .....	139
Gráfico 15:	Curva Klapan-Meier para MMP2 .....	140
Gráfico 16:	Curva Klapan-Meier para ABCC2.....	141





# Índice

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN.....	25
<b>1. Cáncer de Cabeza y Cuello.....</b>	<b>27</b>
<b>1.1 Epidemiología.....</b>	<b>27</b>
1.1.1. El cáncer de laringe .....	28
1.1.2. El cáncer de labio, cavidad oral y la faringe .....	28
<b>1.2. Factores de riesgo y causas .....</b>	<b>30</b>
1.2.1 Tabaco y alcohol.....	30
1.2.2 Virus del papiloma humano.....	31
1.2.3 Alimentación deficiente.....	32
1.2.4 Síndromes genéticos.....	33
1.2.5 Exposición a radiaciones .....	33
<b>1.3. Biología molecular del CCC .....</b>	<b>34</b>
1.3.1. Cancerización de campo.....	36
<b>1.4. Anatomía e histología .....</b>	<b>38</b>
<b>1.5. Diagnóstico y Estadificación TNM.....</b>	<b>42</b>
1.5.1.Exploración física.....	42
1.5.2. Confirmación histológica .....	43
1.5.3. Exámenes complementarios y estudio de extension .....	43
1.5.4. Estadificación .....	44
<b>1.6. Factores pronósticos .....</b>	<b>45</b>
1.6.1. Factores pronósticos relacionados con el paciente .....	46
1.6.1.1. Edad.....	46
1.6.1.2. Sexo y raza .....	47
1.6.1.3. Exposición al alcohol y tabaco .....	47
1.6.1.4. Comorbilidades.....	48
1.6.1.5. Estado nutricional.....	48
1.6.2. Factores relacionados con el tumor .....	49
1.6.2.1. Tamaño del tumor.....	49
1.6.2.2.Estado de los márgenes .....	50
1.6.2.3.Grado de diferenciación.....	50
1.6.2.4.Ganglios linfáticos.....	50
1.6.2.5.Extensión extracapsular.....	51
1.6.3. Factores moleculares .....	51
<b>1.7. Tratamiento.....</b>	<b>53</b>
1.7.1. Cirugía .....	53

1.7.2. Radioterapia .....	54
1.7.2.1 Técnica 2 D .....	54
1.7.2.2 Técnica 3D .....	54
1.7.2.3 IMRT .....	54
1.7.3. El papel de la quimioterapia .....	56
<b>2. Farmacogenética .....</b>	<b>61</b>
<b>2.1 Agentes platinados .....</b>	<b>62</b>
<b>2.2 Mecanismos básicos de reparación del ADN .....</b>	<b>64</b>
2.2.1 Vía Nucleotide Excision Repair.....	64
2.2.2 Vía Base Excision Repair .....	65
2.2.3 Vía Mismatch Repair .....	67
2.2.4 Reparación por recombinación de roturas de la doble cadena.....	68
<b>2.3 Transportadores de membrana .....</b>	<b>70</b>
<b>2.4 Detoxificación .....</b>	<b>72</b>
<b>3. Justificación del estudio.....</b>	<b>73</b>
CAPÍTULO II HIPÓTESIS .....	75
CAPÍTULO III OBJETIVOS.....	79
CAPÍTULO IV MATERIAL Y MÉTODOS.....	83
<b>4.1 Diseño, sujetos de estudio .....</b>	<b>85</b>
<b>4.2 Aspectos éticos del estudio.....</b>	<b>86</b>
<b>4.3 Descripción de variables.....</b>	<b>86</b>
<b>4.4 Tratamiento y dosificación .....</b>	<b>89</b>
<b>4.5 Extracción del ADN .....</b>	<b>91</b>
<b>4.6 Cuantificación del ADN.....</b>	<b>94</b>
<b>4.7 Selección de genes y SNPs .....</b>	<b>94</b>
<b>4.8 Genotipado.....</b>	<b>100</b>
4.8.1 MassArray iPLEX Gold.....	100
4.8.1.1 Principios metodológicos de la discriminación alélica por iPLEX.....	100
4.8.1.2 Ensayo de discriminación alélica por iPLEX .....	100
<b>4.9 Análisis estadístico .....</b>	<b>105</b>
CAPÍTULO V RESULTADOS.....	109
<b>5.1 Características de los sujetos de estudio .....</b>	<b>111</b>
<b>5.2 Factores relacionados con el tumor .....</b>	<b>111</b>
<b>5.3 Tratamiento .....</b>	<b>113</b>

5.3.1 Tratamiento radical.....	114
5.3.1.1 Respuestas .....	114
5.3.1.2 Toxicidades.....	115
5.3.1.3 Recidivas y metástasis a distancia.....	116
5.3.2 Tratamiento adyuvante .....	116
5.3.2.1 Toxicidades.....	117
5.3.2.2 Recidivas y metástasis a distancia.....	118
<b>5.4 Genotipado de los polimorfismos .....</b>	<b>118</b>
<b>5.5 Asociación de polimorfismos con toxicidades .....</b>	<b>120</b>
5.5.1 Toxicidad hematológica .....	120
5.5.3 Toxicidades graves .....	122
<b>5.6 Genes involucrados en la respuesta .....</b>	<b>126</b>
<b>5.7 Interacciones entre SNPs .....</b>	<b>129</b>
<b>5.8 Análisis e identificación de haplotipos .....</b>	<b>136</b>
<b>5.9 Supervivencia .....</b>	<b>137</b>
CAPÍTULO VI DISCUSIÓN.....	143
CAPÍTULO VII CONCLUSIONES .....	165
CAPÍTULO VIII ANEXOS .....	165
CAPÍTULO IX REFERENCIAS .....	165





# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN



## 1. Cáncer de Cabeza y Cuello

Los carcinomas de cabeza y cuello (CCC) engloban una gran diversidad de neoplasias con diferencias en su incidencia, forma clínica de presentación, progresión de la enfermedad, enfoque terapéutico y pronóstico. Son tumores relativamente frecuentes y en la mayoría de los casos se presentan en estadios avanzados de la enfermedad.

Bajo el término de cáncer de cabeza y cuello se incluye a un grupo heterogéneo de tumores que se localizan en los senos paranasales y cavidad nasal, nasofaringe, orofaringe (amígdala, paladar blando y base de la lengua), hipofaringe, laringe (glotis, subglotis y supraglotis), cavidad oral (mucosa oral, encía, paladar duro, lengua móvil y suelo de boca), labio y glándulas salivares. Se excluyen de esta definición los tumores de esófago, neoplasias cutáneas, del sistema nervioso y tiroides.

### 1.1 Epidemiología

A partir de los datos recogidos en el proyecto GLOBOCAN 2012, se han estimado para el 2012 alrededor de 14,1 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados en todo el mundo y 8,2 millones de muertes por cáncer (1).

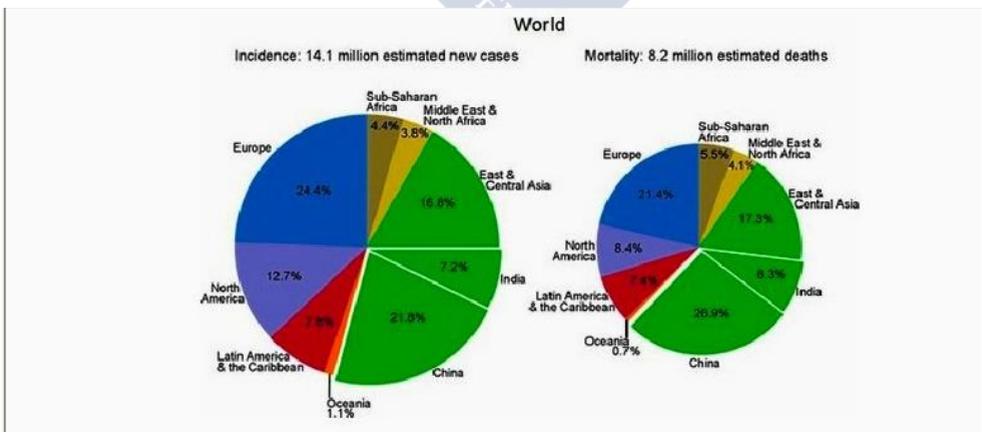


Gráfico 1: Estimaciones mundiales de incidencia y mortalidad por cáncer

El CCC constituye en conjunto la séptima neoplasia con mayor incidencia en la población mundial. En 2010 se han diagnosticado 634.760 nuevos casos y 356.705 muertes secundarias debido a estos tumores a nivel mundial. En Europa, ocupa el sexto lugar con 113.825 casos nuevos, o una incidencia de 4,2 casos cada 100.000 habitantes y representa la séptima causa principal de muerte por cáncer. Su incidencia varía dependiendo de la localización anatómica considerada (2).

### 1.1.1. El cáncer de laringe

- El cáncer de laringe es el decimocuarto cáncer más común entre los hombres, pero es relativamente poco frecuente en las mujeres: de los 157 000 nuevos casos estimados en el mundo en 2012, menos de 19 000 ocurrieron en mujeres. El número total estimado de muertes por cáncer de laringe es aproximadamente 83 000.
- Alrededor del 53% de los casos ocurrieron en países con niveles altos o muy altos de desarrollo; 49% de los casos ocurrieron en Asia.
- Las tasas de incidencia más altas en los hombres tienden a ser observadas en el este de Europa y en algunos países del Caribe.

### 1.1.2. El cáncer de labio, cavidad oral y la faringe

- Para los cánceres de la cavidad oral y la faringe, se estiman 529 000 nuevos casos en el mundo en 2012, con 292 000 muertes. Cuando las principales localizaciones (labio, cavidad oral, nasofaringe, y faringe) se examinan por separado, no estarían en los primeros puestos, pero combinados, el cáncer cervical aparece como el séptimo tipo más frecuente de cáncer en la incidencia y la novena causa más común de muerte por cáncer.
- Las tasas de incidencia más altas se encuentran en Papúa Nueva Guinea, Bangladesh, Hungría, y Sri Lanka. De 120 000 nuevos casos y 88 000 muertes que se producen en la India representan casi una cuarta parte y un tercio, respectivamente, de la carga total de estos tipos de cáncer.
- Las tendencias de incidencia muestran un descenso desde los años 1990 en las poblaciones donde las tasas eran altas (India, China, la población afroamericana en los EE.UU., Australia),

en ambos sexos. Por el contrario, algunas poblaciones históricamente con más bajas tasas de incidencia muestran tendencias crecientes (por ejemplo, Dinamarca, Japón).

**Tabla 1: Muestra la tasa estimada de la incidencia y mortalidad por sexo y localización**

	Incidencia				Mortalidad			
	Cavidad oral y faringe		Laringe		Cavidad oral y faringe		Laringe	
	H	M	H	M	H	M	H	M
EU-27	18.3	5.5	8.3	0.9	7.2	1.7	3.4	0.3
España	16.8	4.2	11.0	0.9	5.8	1.3	4.3	0.3

Incidencia y mortalidad para todas las edades. Prevalencia a 5 años sólo en población adulta. Proporciones por 100.000

¡Fuente: Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC.

En Europa el tumor más frecuente es el de laringe seguida de orofaringe, cavidad oral y nasofaringe. En cuanto a la mortalidad, disminuyó en hombres en los últimos 10 años pero se mantuvo relativamente constante en mujeres.

La edad de aparición se sitúa en una media de 60 años, siendo más baja si se trata de tumores de nasofaringe y glándulas salivares. Según los datos del estudio EUROCCARE (European cancer registry based study on survival and care of cancer patients) la supervivencia a los 5 años aumentó para todos los tipos de CCC y también se ha reducido las diferencias de supervivencia entre países, lo que sugiere una reducción de las desigualdades en la calidad y acceso al tratamiento en Europa (3).

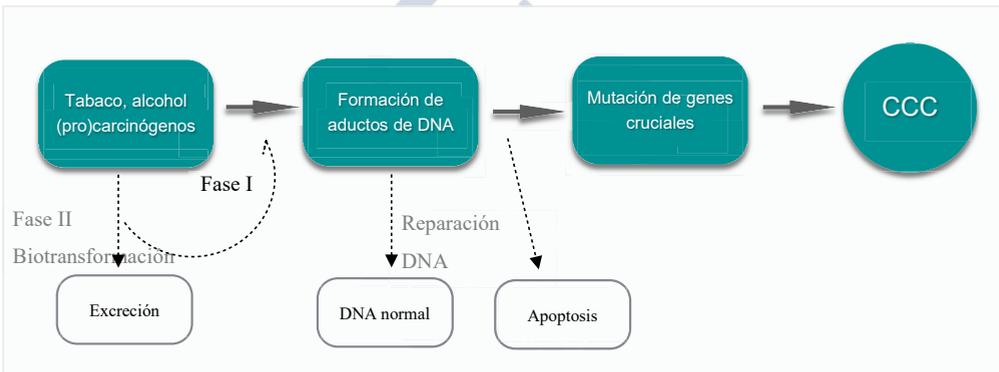
Numerosos estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto la relación entre el consumo de tabaco en todas sus formas y el CCC. El incremento del riesgo de CCC en pacientes fumadores se sitúa entre tres y 12 veces respecto a los no fumadores, y está directamente relacionado con la dosis y duración del consumo. Este riesgo aumenta sinérgicamente si se combina con el consumo de alcohol. Entre el 15% - 20% de los pacientes con CECC no tienen una historia de alcohol o tabaco conocida; este grupo puede incluir adultos jóvenes y mujeres, con posible exposición a otros factores contribuyentes como, el virus del papiloma humano, subtipo 16 (VPH-16) y el Virus de Epstein-Barr (VEB) o alteraciones en genes supresores como p53 (4).

## 1.2. Factores de riesgo y causas

La mayoría de los cánceres de cabeza y cuello son carcinomas de células escamosas que se desarrollan en el epitelio digestivo superior después de la exposición a agentes carcinógenos como el tabaco y el alcohol. El virus del papiloma humano también ha sido implicado como un agente causante en un subconjunto de estos cánceres.

### 1.2.1 Tabaco y alcohol

Numerosos estudios epidemiológicos describen un riesgo aumentado a padecer una neoplasia en esta localización, así como una disminución del riesgo cuando se abandona este hábito (5-8).



**Fig 1: Esquema de carcinogénesis relacionada con el tabaco y el alcohol y mecanismos de defensa anticarcinogénicos**

La actividad carcinogénica del tabaco reside en las diferentes partículas que contiene el humo, que actúan como iniciadores, promotores o co-carcinógenos. Aproximadamente el 90% de los pacientes con CCC tienen una historia de consumo de tabaco y el incremento del riesgo en fumadores de desarrollar cáncer de la cavidad oral, orofaringe e hipofaringe es de 4 a 5 veces y de 10 veces para el cáncer de laringe.

Procesos como la biotransformación, la desintoxicación y eliminación de (pro) carcinógenos junto con los mecanismos de reparación del ADN y las vías de apoptosis (9), son probablemente los factores de defensa más importantes del cuerpo contra el tabaco y el alcohol en CECC (ver fig 1).

Los efectos carcinogénicos del tabaco son dosis-dependientes y se ha visto que está directamente relacionado con la frecuencia, duración e intensidad de cigarrillos.

El consumo de alcohol aumenta de forma independiente el riesgo de CCC, aproximadamente entre un 1-4% de casos son atribuibles sólo al alcohol, sin embargo el riesgo de cáncer de hipofaringe se encuentra aumentado cuando se compara con otros sitios (10). El impacto es multiplicativo si se combinan los efectos del alcohol y tabaco

El tabaco sin humo y masticar nuez de areca (es una mezcla utilizada en diferentes regiones de Asia compuesta por varios ingredientes, tabaco y semillas de este árbol envueltos en una hoja de betel) están relacionados con el desarrollo de carcinoma de la cavidad oral (11, 12).

### 1.2.2 Virus del papiloma humano

El virus del papiloma humano (VPH) es un grupo heterogéneo de virus ADN que incluye más de 100 tipos, sólo un pequeño número de éstos son considerados de alto riesgo o cancerígenos (13), tipificados molecularmente de acuerdo con la secuencia de los ácidos nucleicos que componen su genoma, y definidos por tener marcos de lectura abiertos en L1, E6 y E7 que difieren en más de 10 %.

La mayoría de carcinomas relacionados con VPH contienen ADN de VPH integrado en el genoma de las células huésped y expresan dos genes virales, E6 y E7, ambos codificadores de oncoproteínas que inactivan genes supresores de tumores (p53 y Rb), y por tanto, favorecen la transformación de la célula huésped en tumoral (14, 15).

En un estudio de casos y controles de D'Souza y cols. se encontró que el cáncer de orofaringe se asociaba significativamente con la presencia de la infección oral de HPV-16. Se detectó en 72% de muestras tumorales orofaríngeas ADN de VPH y el 64% de los pacientes en el estudio eran seropositivos para VPH-16 E6, HPV-16 E7, o para ambas (16).

Según el metaanálisis de Dayyani publicado en 2010, la proporción de CECC relacionado con VPH es del 22% aumentando al 41% en el subgrupo de orofaringe. El VPH16 es el subtipo dominante en el CECC seguido del 18, 31 y 33. A continuación se detallan las principales diferencias entre el VPH positivo y negativo, Tabla 2:

**Tabla 2: Diferencias entre tumores de cabeza y cuello VPH positivo y negativo**

	VPH positivo	VPH negativo
Sexo	4- 5 veces más común en hombres	2-3 veces más común en hombres
Edad	Comienzos o mediados de los 50 con un incremento de la incidencia en jóvenes	media de edad 50-60 años
Raza	Mayor incidencia en raza blanca	Peor pronóstico en raza negra
Hábitos	50-65% tienen historia tabáquica El alcohol no es un factor de riesgo significativo	>90% historia tabáquica y el riesgo aumenta con el incremento del uso del tabaco. Incrementa el riesgo con sinergismo de alcohol y tabaco
Historia sexual	Número de parejas de sexo oral es un factor de riesgo	No es un factor de riesgo significativo
Sitio	Orofaringe y en el tejido linfóide de las amígdalas y base de lengua.< 20% en otros sitios	Laringe y cavidad oral las más comunes
Incidenia	Ascenso	Descenso
Pronóstico	Orofaringe: supervivencia a los 5 años entre el 60-90%, recurrencia a los 5 años entre el 10-15%	Todos los sitios: supervivencia a los 5 años 65%, recurrencia a los 5 años 50%. Orofaringe:supervivencia a los 5 años entre el 20-25%, recurrencia a los 5 años entre el 50%

### 1.2.3 Alimentación deficiente

Una nutrición deficiente puede aumentar el riesgo de padecer CCC. La razón exacta de esto se desconoce. A menudo, las personas que abusan del alcohol tienen deficiencias vitamínicas, lo que puede ayudar a explicar el papel que desempeña el alcohol en el riesgo aumentado para estos tumores.

El consumo de frutas y verduras se ha asociado con un riesgo reducido de CECC, por el contrario existe una relación directa de la incidencia con el consumo de grasas animales, fritos y ahumados (17).

### 1.2.4 Síndromes genéticos

Ciertos tipos de cáncer tienen una fuerte predisposición genética, sin embargo, el CECC, salvo algún caso familiar raro, es una enfermedad multifactorial.

Las personas con ciertos síndromes ocasionados por defectos heredados (mutaciones) en algunos genes tienen un riesgo muy alto de presentar cáncer de boca y de garganta (18). Es el caso de la anemia de Fanconi: afección que puede ser causada por defectos heredados en varios de los genes que contribuyen a reparar el ADN.

### 1.2.5 Exposición a radiaciones

Exposiciones largas e intensas al polvo de la madera, los vapores de pintura, y ciertos productos químicos utilizados en la metalurgia, petróleo, plásticos, textiles y en las industrias pueden aumentar el riesgo de los cánceres de laringe y de hipofaringe.

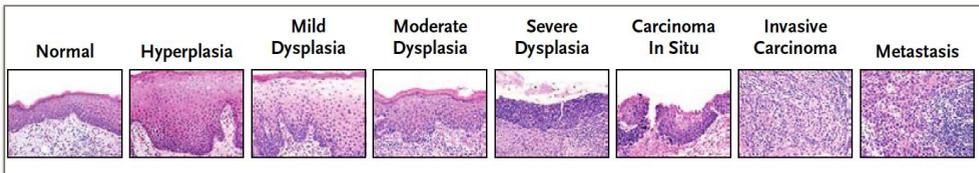
La exposición a radiaciones ultravioleta se asocia a un aumento del riesgo de cáncer de labio inferior y en el caso de las radiaciones gamma la incidencia aumenta en el cáncer de glándulas salivares, senos paranasales y sarcomas de cabeza y cuello (19).

**Tabla 3: Factores de riesgo del CCC**

FACTORES DE RIESGO
Tabaco
Alcohol
Virus del papiloma humano
Sexo masculino
Edad avanzada
Tabaco de mascar indio (betel quid o gutka)
Otros factores de riesgo:
Lesiones premalignas incluyendo leucoplasia y eritoplasia
VIH y/o supresión inmune
Pobre higiene bucal
Síndrome de Li Fraumeni
Virus Epstein-Barr (alta incidencia en el sudeste asiático)
Dieta, incluyendo una pobre nutrición, pobres en folato

### 1.3. Biología molecular del CCC

Suelen ser el resultado de la acumulación de varias alteraciones en el material genético que provoca que las células adquieran progresivamente capacidad proliferativa y de diseminación. Estos cambios afectan a genes reparadores, protooncogenes y genes supresores. Los primeros cambios histológicos que sufre la mucosa normal es la hiperplasia, que se caracteriza por un aumento de la densidad celular del epitelio y por la acumulación de queratina en la superficie de la mucosa, la lesión suele ser reversible y no se considera neoplásica (Fig.2).



**Fig 2: Histología de las diferentes etapas. Modelo de progresión en CCC. Imagen de Argiris y cols. (82).**

Cuando la acumulación de queratina es evidente estas lesiones se denominan leucoplasias y la presencia de esta leucoplasia se asocia con un aumento del riesgo de desarrollar displasia o carcinoma escamoso (20, 21).

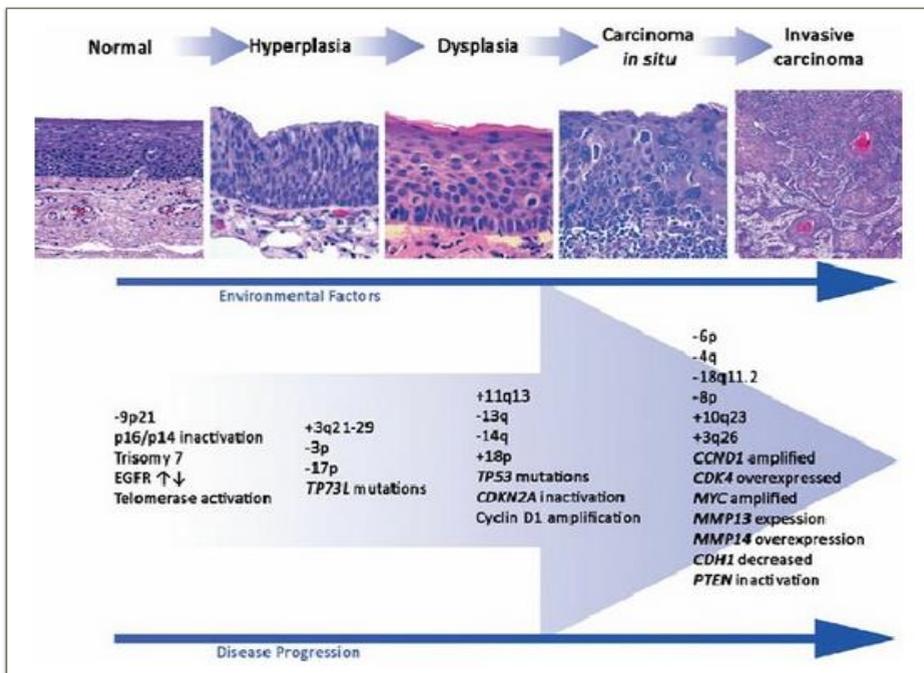
La hiperplasia puede manifestarse con aparición de manchas rojizas en la mucosa aerodigestiva denominándose eritrodismplasias, que suelen ser menos frecuentes que las leucoplasias pero se asocian de modo más significativo al carcinoma escamoso.

La displasia es una lesión premaligna que se caracteriza por la falta de maduración de la mucosa, por la presencia de células atípicas celulares y por las alteraciones del tamaño del citoplasma. Las displasias se clasifican según el grado de diferenciación en medias, moderadas o severas; las displasias severas que presentan una pérdida aguda de la maduración del epitelio y una elevada presencia de atipias celulares se denominan carcinomas in situ, y cuando estas células tumorales invaden el espacio submucoso se produce la transición de carcinoma in situ a invasivo (22).

Hay una pérdida de la maduración, una desorganización de la arquitectura, y un aumento de pleomorfismo y tamaño de la célula con disqueratosis y el aumento de mitosis en un grado variable con cada grado de displasia. Aunque la duración de la evolución de displasia a

carcinoma invasivo es bastante variable, se mide generalmente en años. Es durante este intervalo que la progresión de la enfermedad puede ser alterado por los cambios en los hábitos (tabaquismo, consumo de alcohol) o una intervención quirúrgica.

Una multitud de eventos genéticos que conducen a la inactivación de genes supresores o a la activación de proto-oncogenes, o ambas cosas, regulan el desarrollo de los CECC. Técnicas moleculares pueden identificar alteraciones genéticas y epigenéticas en las lesiones premalignas e invasoras, y permitir la delimitación de un modelo de progresión hipotética para la carcinogénesis en CECC.



**Fig 3: Presentación de los eventos genéticos y epigenéticos que determinan la progresión en la carcinogénesis del CCC. Imagen de Ferlay y cols (1)**

La telomerasa, que está involucrada en el mantenimiento de los telómeros y la inmortalización se ha encontrado que puede estar reactivada en el 90% de CECC y en lesiones premalignas (23). La pérdida de 9p21 es una aberración genética muy común, constante y precoz ya que se observa en el 70-80% de CECC (24). La inactivación de p16, que es causada por deleciones homocigotas, mutaciones puntuales, o hipermetilación del

promotor; y la pérdida de 3p, podrían ser los primeros eventos en la carcinogenesis del CECC. La pérdida de heterocigosidad de 17p y mutaciones puntuales TP53 se ven en más del 50% de los casos de CECC.

Entre los genes de expresión temprana se reconocen los oncogenes virales E6 y E7, cuyas proteínas interfieren con el normal funcionamiento de las proteínas celulares p53 y pRb, respectivamente (25). De esta forma se pierde el control de la progresión del ciclo celular con la consecuente proliferación descontrolada e inmortalización celular. Esto permite además la acumulación de eventos relacionados con inestabilidad genética que contribuyen a la carcinogénesis.

La amplificación de 11q13 y la sobreexpresión de ciclina D1 son también detectados en CECC, y podrían correlacionarse con más agresividad del tumor y progresión tumoral (26). Genes supresores como Rb y p16, son reguladores negativos de ciclina D1 y están generalmente inactivados en los CCC (27).

### 1.3.1. Cancerización de campo

Los pacientes con CCC presentan con frecuencia segundos tumores sincrónicos o metacrónicos en la vía aerodigestiva.

Los tumores primarios o secundarios se originan en un área de epitelio previamente modificada por la exposición prolongada a mutágenos del medio ambiente. Este concepto, descrito por primera vez por Slaughter en 1953, propone que los tumores se desarrollan de manera multifocal dentro de un campo tisular que está expuesto crónicamente a agentes cancerígenos (28).

Se han desarrollado dos teorías para intentar explicar la alta frecuencia de segundos tumores en este grupo de pacientes. Una de ellas se basa en la extensión por continuidad de micrometástasis portadoras de células malignas o premalignas al epitelio vecino y la segunda teoría está basada en el concepto de cancerización de campo, en el que los tumores, tanto sean primarios o secundarios, se originan en un área del epitelio previamente acondicionada por la exposición prolongada a mutágenos medioambientales (29).

Recientemente se ha sugerido que la cancerización de campo dependería de una célula transformada que sufriría una expansión clonal y reemplazaría gradualmente a la mucosa normal por epitelio malignizado. A lo largo de la zona, sucesivas alteraciones genéticas darían

lugar a distintos subclones y, por tanto, a tumores aparentemente distintos que provendrían del mismo clon original (30).

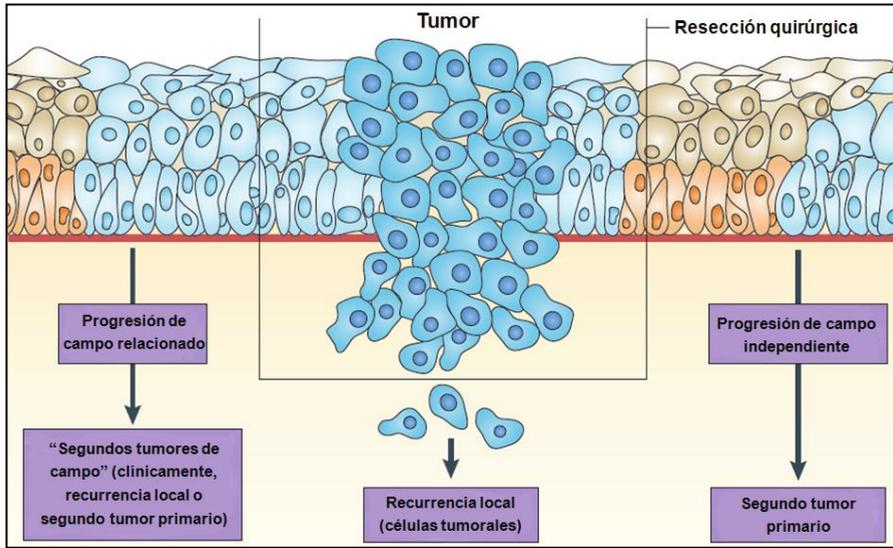


Fig 4: Proceso de cancerización de campo y los tipos de recaída. Imagen de Leemans y col (31).

El conocimiento actual de los mecanismos moleculares implicados en la regulación del ciclo celular ha posibilitado dar una interpretación molecular a este fenómeno y definir de forma más precisa la naturaleza de los segundos tumores que aparecen en algunos pacientes (32). Los eventos oncogénicos moleculares más precoces en el desarrollo del cáncer oral son las mutaciones del gen TP53 y la pérdida de heterocigosidad (LOH) en los loci cromosómicos 3p, 9p y 17p. Estas regiones cromosómicas albergan importantes genes reguladores del ciclo celular. La consecuencia de las alteraciones genéticas precoces será que la célula alterada adquiere una ventaja proliferativa sobre el resto de las células del epitelio de la mucosa oral. Se crea así un campo precanceroso expansivo que va progresivamente reemplazando al epitelio oral normal. Todas las células de este campo precanceroso comparten las mismas alteraciones genéticas precoces. Por definición, los campos precancerosos son expansivos aunque no invasivos.

No han adquirido aun la capacidad de atravesar la membrana basal del epitelio y acceder al corion, lugar en el que el proceso metastáticos es posible. Esta capacidad invasiva define al

cáncer y marca la diferencia entre campo precanceroso y cáncer. La capacidad invasiva se adquiere presumiblemente por la suma de eventos oncogénicos más tardíos, como son las alteraciones en los loci cromosómicos 8p, 13q y 18q. Posiblemente, también otras alteraciones genómicas ligadas a la pérdida de expresión y función de las moléculas de adhesión, se asocian a la adquisición de capacidad invasiva por parte de las células del campo precanceroso.

#### **1.4. Anatomía e histología**

La región de la cabeza y cuello tiene una gran complejidad anatómica y funcional, constituye un grupo heterogéneo de tumores que pueden situarse sobre diversas estructuras anatómicas:

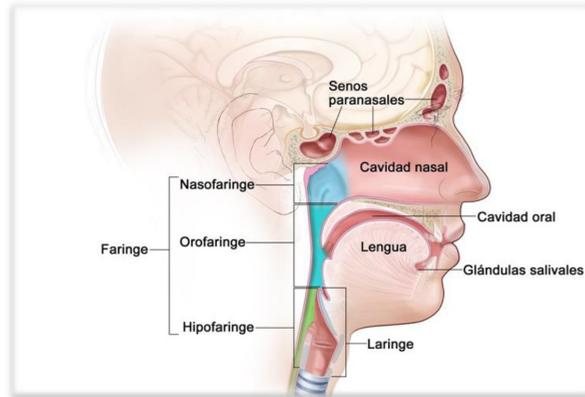
**Cavidad oral:** Comprende los labios, dos terceras partes del frente de la lengua, las encías, el revestimiento dentro de las mejillas y labios, la base de la boca debajo de la lengua, el paladar duro (parte superior ósea de la boca) y la zona pequeña de la encía detrás de las muelas del juicio.

**Faringe:** La faringe (garganta) es un tubo hueco de 14-15 mm de longitud que comienza detrás de la nariz y se extiende hasta el esófago. Tiene tres partes: la nasofaringe (la parte superior de la faringe, detrás de la nariz); la orofaringe (la parte central de la faringe, incluido el paladar blando -la parte de atrás de la boca-, la base de la lengua y las amígdalas); y la hipofaringe (la parte inferior de la faringe).

**Laringe:** La laringe es un conducto corto formado por cartílago situado justo abajo de la faringe en el cuello. La laringe contiene las cuerdas vocales. Tiene también un tejido pequeño, llamado epiglotis, el cual se mueve para cubrir la laringe e impedir que los alimentos entren en las vías respiratorias.

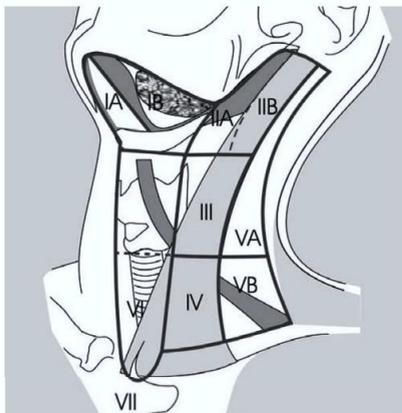
**Senos paranasales y cavidad nasal.** Los senos paranasales son pequeños espacios huecos en los huesos de la cabeza localizados alrededor de la nariz. La cavidad nasal es el espacio hueco dentro de la nariz.

**Glándulas salivales.:** La mayoría de las glándulas salivales se encuentran en el piso de la boca y cerca de la mandíbula. Las glándulas salivales producen saliva.



**Fig 5: Regiones en el cáncer de cabeza y cuello. Fuente: National Cancer Institute**

Los niveles del cuello están estandarizados para unificar criterios de tratamiento. Los ganglios del cuello se distribuyen en 10 grupos ganglionares que, a efectos clínicos, se dividen en 7 niveles que tienen su correlación anatomorradiológica (33):



**Fig 6: Esquema que muestra los niveles y subniveles ganglionares del cuello (33).**

**Nivel I:** Contiene los ganglios submandibulares y submaxilares. Está limitado hacia abajo por el vientre anterior y posterior del músculo digástrico y el hueso hioides y hacia arriba por el cuerpo de la mandíbula.

**Nivel II:** Contiene los ganglios yugulares superiores y se extiende por arriba desde la base del cráneo hasta el hueso hioides por debajo.

**Nivel III** Contiene los ganglios yugulares medios. Se extiende desde el hueso hioides por arriba hasta el borde inferior del cartílago cricoides por debajo.

**Nivel IV** Contiene los ganglios yugulares bajos. Se extiende desde el borde inferior del cartílago cricoides por arriba hasta la clavícula por debajo.

**Nivel V** Contiene los ganglios en el triángulo posterior, limitado por detrás por el borde anterior del músculo trapecio, por delante por el borde posterior del músculo esternocleidomastoideo y por debajo por la clavícula. Con propósitos descriptivos puede ser

divido en niveles alto, medio y bajo según dos planos horizontales que pasan, el superior por el hueso hioides y el inferior por el borde inferior del cartílago cricoideos.

**Nivel VI** Contiene los ganglios del compartimento central. Se extiende desde el hueso hioides por arriba, hasta el hueco supraesternal por debajo. Sus límites laterales lo forman, a cada lado, los bordes internos de la vaina carotídea.

**Nivel VII** Contiene los ganglios por debajo del hueco supraesternal, ubicados en el mediastino superior.

En cuanto a la terminología de las disecciones cervicales: la disección radical incluye la resección de todos los grupos ganglionares cervicales ipsilaterales (ganglios de niveles I al V) así como del nervio espinal, vena yugular interna y músculo esternocleidomastoideo.

En una disección cervical radical modificada (“funcional”, en la terminología hispana) se resecan los mismos grupos ganglionares que en una disección cervical radical, preservándose, sin embargo una o más estructuras no linfáticas (XI par, vena yugular interna o músculo esternocleidomastoideo).

Un vaciamiento cervical selectivo es aquel en que se preservan uno o más de los grupos linfáticos rutinariamente resecaos en una disección radical cervical. Los vaciamientos cervicales más comunes son:

- a) Vaciamiento supraomohioideo : niveles I-III
- b) Vaciamiento posterolateral : niveles II-V, así como ganglios retroauriculares y occipitales
- c) Vaciamiento lateral : niveles II, III y IV
- d) Vaciamiento anterior : nivel VI

El diagnóstico definitivo de un CCC viene dado por el estudio histológico del tumor primario. Cuando esto no es posible, por ejemplo si es por debut de una adenopatía cervical con primario oculto, debe realizarse la biopsia de alguna de las adenopatías afectas (es preferible la biopsia a la realización de PAAF). En relación a la anatomía patológica de los CCC, en más del 80-90% de los casos se trata de carcinomas escamosos.

Es un tumor epitelial maligno en el que se observa diferenciación escamosa en forma de puentes intercelulares y/o formación de queratina, y que deriva del epitelio escamoso de superficie o del epitelio ciliado respiratorio. Histológicamente se caracterizan por la

diferenciación escamosa más o menos evidente en grupos de células atípicas y/o células aisladas que invaden desde el epitelio de la mucosa hacia planos profundos, a menudo alcanzando cartílago o hueso con probable permeabilidad vascular venosa y/o linfática e invasión perineural. Estos carcinomas suelen dividirse en poco, moderadamente o bien diferenciados, este grado de diferenciación se evalúa con la morfología según la queratinización, pleomorfismo, atipia celular y el índice de mitosis.

Se considera tumor de bajo grado a aquel que presenta un mayor grado de queratinización y menor atipia e índice mitótico, es decir, tumor bien diferenciado.

Generalmente, los tumores de labio y cavidad oral suelen ser bien diferenciados, mientras que los de localizaciones posteriores suelen ser más indiferenciados, lo que se suele correlacionar con una mayor agresividad clínica. En las glándulas salivares, fundamentalmente en la *parótida*, se presentan habitualmente otros tipos histológicos como pueden ser carcinoma mucoepidermoide, de células acinares, carcinoma adenoide quístico o adenocarcinoma, además de carcinomas epidermoides y carcinomas indiferenciados. Dentro de los tumores de nasofaringe es frecuente la presencia de tumores de extirpe *linfoepitelial*, —*linfoepitelioma* o carcinoma indiferenciado— además de carcinomas queratinizantes, tumores bien diferenciados no queratinizantes.

La gran mayoría de los tumores malignos de cabeza y cuello surgen de la superficie del epitelio y son carcinoma de células escamosas o una de sus variantes, incluyendo linfoepitelioma, carcinoma de células fusiformes, carcinoma verrucoso y carcinoma indiferenciado (Tabla 4). Los linfomas y una amplia variedad de otros tumores malignos y benignos constituyen los casos restantes.

El linfoepitelioma es un carcinoma con estroma linfoide y ocurre en la nasofaringe, fosa amigdalina, y la base de la lengua; también puede ocurrir en las glándulas salivales. En la variante de células fusiformes, que se encuentra entre el 2% al 5% de las neoplasias malignas del tracto aerodigestivo superior, hay un componente de células fusiformes que se asemejan a sarcoma entremezclado con carcinoma de células escamosas. El carcinoma verrugoso es un carcinoma de células escamosas de bajo grado que se encuentra con mayor frecuencia en la cavidad oral, en particular en la encía y la mucosa bucal. Por lo general, tiene un patrón de crecimiento indolente y con frecuencia se asocia con el uso crónico de tabaco o masticar

tabaco. El paciente con carcinoma verrucoso muy a menudo tiene múltiples biopsias de una lesión obvia, pero el patólogo devuelve un diagnóstico de la hiperqueratosis o hiperplasia pseudoepiteliomatosa. De novo los carcinomas verrucosos raramente desarrollan metástasis en los ganglios linfáticos.

**Tabla 4: Variantes del carcinoma escamoso**

Carcinoma verrucoso
Carcinoma de células fusiformes (carcinoma sarcomatoide)
Carcinoma basoescamoso
Carcinoma adenoescamoso
Carcinoma linfoepitelial (indiferenciado)

## 1.5. Diagnóstico y Estadificación TNM

Dada la diversidad anatómica de esta región los síntomas son variados. Los más habituales son dolor local o reflejo, ulceraciones, disfonía, estridor, disfagia, obstrucción nasal, otorrea.. Los principales hallazgos del examen físico es la presencia de una masa o ulceración en la cavidad oral u orofaringe, masa en el cuello, parálisis de las cuerdas vocales, la disfunción al tragar.

### 1.5.1.Exploración física

Debe realizarse una exploración física completa en todo paciente con sospecha de CCC.

- Examen de la cavidad oral y orofaringe.
- *Laringoscopia* indirecta.
- Palpación cuidadosa de todas las cadenas ganglionares.
- Otras exploraciones en función de las manifestaciones clínicas presentes.

### 1.5.2. Confirmación histológica

El diagnóstico definitivo de un CCC viene dado por el estudio histológico del tumor primario.

### 1.5.3. Exámenes complementarios y estudio de extensión

Deben realizarse en todos los pacientes:

- Análisis completo que incluya:
  - Hemograma.
  - Bioquímica sérica completa.
- Exploración (panendoscopia)
- Tomografía Computerizada (TC) y/o Resonancia Magnética (RM) toracocervical para un adecuado estudio de la extensión locorregional tumoral.
- Tomografía por Emisión de Positrones (PET) en el caso de que existan adenopatías y ha demostrado superioridad en el diagnóstico de las recurrencias.

La tecnología actual permite la utilización de métodos variados para el diagnóstico por imagen de los ganglios linfáticos patológicos: ecografía, TC, RM, linfogramagrafía para detección de ganglio centinela o PET. En los últimos años se han incorporado los estudios de fusión de técnicas (fundamentalmente PET-TC), que combinan lo mejor de la imagen funcional y anatómica. Las técnicas de imagen morfológicas juegan un papel fundamental en la estadificación, reestadificación y adecuada planificación del tratamiento del CCC. La TC y RM permanecen como las primeras técnicas de referencia para el diagnóstico. Progresivamente, las técnicas funcionales como la 18F-FDG-PET se han incorporado al protocolo diagnóstico y constituyen una ayuda fundamental si se utilizan adecuadamente. La 18F-FDG-PET y 18F-FDG-PET-TC pueden ser de gran utilidad en pacientes de TCC en las siguientes indicaciones:

- Estadificación linfática cervical.
- Detección de metástasis a distancia.
- Identificación de tumor primario desconocido.
- Detección de tumores primarios sincrónicos.
- Monitorización de la respuesta al tratamiento.
- Seguimiento a largo plazo de recurrencias y metástasis.

#### 1.5.4. Estadificación

El estadiaje de la enfermedad en el momento del diagnóstico es el factor pronóstico conocido más importante. El sistema de clasificación TNM (Tumor, Node Metastasis) está basado en el American Joint Committee on Cancer (AJCC).

Alrededor de dos tercios de los pacientes con CECC se presentan con enfermedad en estadio avanzado, que involucra comúnmente ganglios linfáticos regionales. Presentar metástasis a distancia como debut es poco común, surgen en aproximadamente el 10% de pacientes.

Las definiciones para el estadiaje del tumor primario (T), basadas en el tamaño tumoral, es diferente para cada una de las diferentes localizaciones tumorales. Los grupos de estadificación son comunes a todas las zonas de la cabeza y cuello excepto para la nasofaringe (ver ANEXO). La clasificación de las adenopatías regionales (N) es uniforme para todas las localizaciones excepto tiroides, nasofaringe y tumores cutáneos.

#### **T – Tumor primario**

Tx: Datos insuficientes para evaluar el tumor primario

T0: No evidencia de tumor primario

Tis: Carcinoma in situ

T1: Tumor de 2 cm o menos en su diámetro mayor

T2: Tumor de 2 a 4 cm de diámetro mayor

T3: Tumor mayor de 4 cm de diámetro mayor

T4a: Enfermedad local moderadamente avanzada

T4b: Enfermedad local muy avanzada

(las distintas categorías T4a y T4b se describen en las diferentes localizaciones)

#### **N – Adenopatías regionales**

La clasificación N es uniforme para todas las localizaciones excepto para el tiroides, la nasofaringe y los tumores cutáneos.

NX: Los ganglios linfáticos regionales no pueden evaluarse

N0: No hay evidencia de metástasis ganglionares regionales

N1: Metástasis en un ganglio ipsilateral de 3 cm o menos de diámetro mayor

N2: Metástasis en un ganglio ipsilateral de más de 3 cm pero menos de 6 de diámetro mayor, ó en múltiples ganglios ipsilaterales ninguno mayor de 6 cm, o en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales, ninguno mayor de 6 cm.

N2a: Metástasis en un ganglio ipsilateral entre 3 y 6 cm de diámetro mayor

N2b: Metástasis ganglionar múltiple ipsilateral ninguna mayor de 6 cm

N2c: Metástasis ganglionar bilateral o contralateral ninguna mayor de 6 cm

N3 : Metástasis ganglionar de más de 6 cm de diámetro mayor.

### **M – Metástasis a distancia**

Las más comunes son pulmonares (PUL) y óseas (OSS); hepáticas (HEP) y cerebrales (BRA) con menor incidencia.

M0: no evidencia de metástasis a distancia

M1: evidencia de metástasis a distancia \*

\*La categoría Mx fue eliminada de la clasificación TNM.

Clasificación anatomopatológica: es una gradación histológica según el grado de diferenciación celular, se aplican en todas las localizaciones excepto en el tiroides.

Gx : El grado histológico no puede definirse

G1 : Bien diferenciado

G2 : Moderadamente diferenciado

G3 : Pobrementemente diferenciado

G4 : Indiferenciado

## **1.6. Factores pronósticos**

Se denominan factores pronósticos a aquellos datos que nos suministran información sobre la evolución de la enfermedad, es decir, intenta explicar por qué pacientes con el mismo diagnóstico evolucionan de manera distinta.

**Tabla 5: Principales factores pronósticos del CCC**

Procedimiento	Mal pronóstico	Buen pronóstico
Modo invasivo	Infiltrante	Vegetante
Diferenciación	Poco, indiferenciado	Bien
Localización	Hipofaringe Seno esferoidal y frontal Supraglotis	Cavidad oral Seno maxilar o etmoidal Glottis
Ploidía	Aneuploidía	Diploidía, fase S baja
Biología molecular	PÉRDIDAS 9p21 (MTSI) 17p13 (TP53)	AMPLIFICACION ES 11q13 (PRAD1) 7p12-14 (ERB1)
FISH	Aneusomía y polisomía 8 y 9	
Inmunohistoquímica	Ki67, ciclina D1, p53, CD44	E-cadherina

Los factores pronóstico nos permiten estratificar a los pacientes en grupos con semejantes características y también en cuanto a distintos tratamientos comparando las respuestas, recurrencias, supervivencia y calidad de vida, entre otros.

### 1.6.1. Factores pronósticos relacionados con el paciente

#### 1.6.1.1. Edad

La edad avanzada constituye para algunos autores un factor de mal pronóstico, relacionándose con una menor supervivencia y mayor riesgo de complicaciones derivadas de los tratamientos locorregionales y sistémicos, aunque existen controversias.

Siegelman-Danieli y cols. examinaron una cohorte retrospectiva de 87 pacientes de cáncer de lengua, 30 de los cuales eran menores de 45 años de edad en el momento del diagnóstico, y encontraron que la edad no influyó en las tasas de recaída o en la supervivencia.

Del mismo modo, Verschuur y cols. llevaron a cabo un estudio de casos y controles retrospectivo en 185 pacientes menores de 40 años, en los que la edad no influyó en la supervivencia, sin embargo, los pacientes de mayor edad tenían el doble de probabilidades de desarrollar segundos tumores en las vías aerodigestivas superiores (14% vs. 7%), posiblemente debido al mayor hábito tabáquico (34).

En un estudio prospectivo de 203 pacientes con CCC, la edad avanzada se correlacionó con el empeoramiento de la supervivencia global a los 2 años en el análisis univariante, pero esta asociación no fue significativa cuando se ajustó por estadio TNM y por la presencia de comorbilidades (35). En el meta-análisis de Pignon y cols. el beneficio de la RQT era menor en edad avanzada, la supervivencia global era significativa para los pacientes menores de 70 años no para los mayores de 71 años (36).

#### 1.6.1.2. Sexo y raza

El sexo no se considera en general un determinante significativo de la supervivencia en pacientes con cáncer de cabeza y cuello. De hecho, la mayoría de las grandes series publicadas no han podido encontrar una diferencia significativa en el resultado con respecto a sexo. Tampoco parecen existir diferencias globales en función de la raza.

Los datos del Programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales (Surveillance, Epidemiology, and End Results, SEER) del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) indican que tanto la incidencia como la mortalidad son más altas en hombres negros que en blancos y que estas diferencias no eran evidentes en mujeres (37).

Recientemente, Settle y cols. propusieron una razón alternativa para el mal pronóstico de los pacientes de raza negra y encontraron tras el análisis del estudio multicéntrico TAX324 que esta disparidad sólo era observada en el grupo de pacientes de orofaringe, en el que la supervivencia global fue de 69.4 vs 25.2 meses (38).

#### 1.6.1.3. Exposición al alcohol y tabaco

El consumo persistente de tabaco tras el diagnóstico se ha relacionado con un incremento de la toxicidad del tratamiento con radioterapia, este efecto adverso se ha observado en dos estudios realizados en pacientes con carcinomas de glotis T1 y T2 tratados con radioterapia y el riesgo de complicaciones se duplicaba a largo plazo (39).

Day et al demostraron que el riesgo de un segundo tumor primario en el tracto aerodigestivo (cavidad oral, faringe, laringe, esófago y pulmón) aumentaba tanto con el número de cigarrillos fumados por día como con los años de tabaquismo, el riesgo era 4,7 veces mayor para aquellos pacientes que fumaban más de 40 cigarrillos al día o para los que fumaron durante 20 años o más (40). Sin embargo, dejar de fumar tras el diagnóstico no disminuyó el riesgo de segundas neoplasias en los primeros 5 años después del diagnóstico pero se observó una reducción del riesgo de forma significativa pasados los 5 años después de dejar de fumar. Del mismo modo, los consumidores de 15 o más cervezas por semana experimentaron un aumento del riesgo 3.8 veces mayor de padecer segundos tumores primarios en el tracto aerodigestivo, en comparación con los no bebedores o los bebedores moderados (0-4 bebidas por semana).

### 1.6.1.4. Comorbilidades

Aunque no se incluye en la estadificación TNM, la influencia de comorbilidades está directamente relacionada con el cuidado de los pacientes con cáncer, la selección de modalidades de tratamiento, y la evaluación de la efectividad del tratamiento. Piccirillo y cols. encontraron que el 24% de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello presentaban comorbilidades moderadas o severas (41).

Un buen estado general antes de iniciar el tratamiento mejora el pronóstico en términos de respuesta y supervivencia global.

### 1.6.1.5. Estado nutricional

La desnutrición es común en pacientes con cáncer de cabeza y cuello y atribuible a una serie de causas, entre ellas, los malos hábitos dietéticos, el consumo excesivo de alcohol, caquexia inducida por tumor, etc.

La relación entre el estado nutricional, las complicaciones postoperatorias y la supervivencia se ha explorado en varios estudios prospectivos. En un análisis de seis parámetros nutricionales diferentes, se observó que una pérdida de peso del 10% en los 6 meses anteriores a la cirugía fue el único factor predictor significativo.

Dada la fuerte evidencia de una asociación entre la desnutrición y un mayor riesgo de complicaciones postoperatorias, ha aumentado el interés en la evaluación de los beneficios de un apoyo nutricional.

Un estudio observacional de 1.073 pacientes tratados con radioterapia radical en el ensayo RTOG 90-03 examinaron la correlación entre el apoyo nutricional inicial, la toxicidad de la radiación, y la supervivencia (42). El apoyo nutricional inicial se definió como cualquiera de los suplementos orales, alimentación enteral, o nutrición parenteral utilizado por el paciente antes de comenzar la radioterapia. El apoyo nutricional se asoció con un riesgo ligeramente más bajo de mucositis grado 3 o 4 inducida por radiación (34% vs 40%). Sin embargo, incluso después de ajustar por posibles factores de confusión, el apoyo nutricional se asoció 1,5 veces más riesgo de fracaso local-regional. Este hallazgo generó la hipótesis de que el soporte nutricional de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello, aunque es beneficioso para mejorar su condición médica en general y para minimizar la toxicidad de la terapia, en realidad puede ejercer un efecto perjudicial sobre los resultados de la terapia. Esta hipótesis claramente merece ser estudiada en mayor profundidad.

## 1.6.2. Factores relacionados con el tumor

### 1.6.2.1. Tamaño del tumor

Tanto el tamaño del tumor como la afectación ganglionar y el estadio global son factores predictores de respuesta y supervivencia. En tumores locoregionales, la afectación ganglionar es un factor pronóstico desfavorable y la supervivencia es inversamente proporcional al número y tamaño de los ganglios afectos.

Moore y cols. encontraron que el grosor del tumor es un predictor más consistente de metástasis ganglionar concomitante y supervivencia libre de enfermedad a los 3 años que el diámetro de superficie tumoral (43).

La estimación del volumen del tumor a partir de pruebas de imagen, parece ser un mejor predictor de control local en tumores de orofaringe e hipofaringe tratados con radioterapia que el tamaño del tumor (44).

#### 1.6.2.2.Estado de los márgenes

La presencia de carcinoma residual en los márgenes de la resección quirúrgica es un importante factor de riesgo para la recurrencia local en CECC. La presencia de márgenes positivos ha demostrado predecir la recurrencia local o local-regional para las diferentes localizaciones anatómicas (45).

Para pacientes con márgenes positivos la radioterapia postoperatoria es uno de los factores más importantes que influyen en el control local. Zelefsky y cols. observaron una tasa de control local a los 7 años del 92% en los pacientes que recibieron una dosis total de radioterapia postoperatoria  $\geq 60$  Gy, en comparación con el 44% en los pacientes que recibieron  $< 60$  Gy (46).

#### 1.6.2.3.Grado de diferenciación

En cuanto al grado de diferenciación, los tumores más diferenciados se asocian con menor afectación ganglionar y menos recidivas locales. El carcinoma basaloide escamoso de cabeza y cuello es una variante rara que históricamente se ha pensado que era quimio y radiosensible, con mayores controles locoregionales pero con un mayor riesgo de metástasis a distancia (47). Soriano y cols. en una serie de casos y controles tratados con diferentes modalidades de tratamiento, observó que las recurrencias locoregionales causaron la muerte en un 15% de los pacientes con histología basaloide frente al 51% de los CCE, sin embargo, las metástasis a distancia se produjeron en un 45% de los BSCC (48).

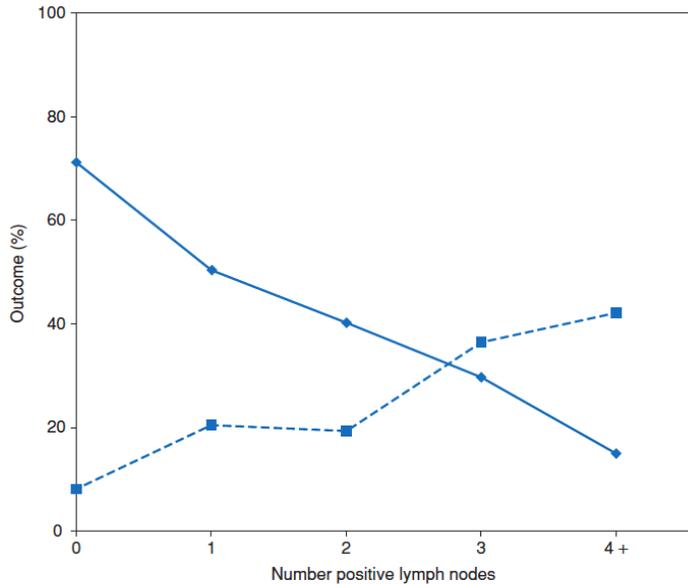
#### 1.6.2.4.Ganglios linfáticos

Número de ganglios linfáticos positivos

El número, tamaño y localización de los ganglios linfáticos cervicales positivos definen la etapa N para CECC y proporcionan información importante sobre el pronóstico y la selección del tratamiento (49). La supervivencia está inversamente relacionada con el número y tamaño de los ganglios afectados. El número de ganglios positivos predice el riesgo de enfermedad metastásica a distancia para todos los sitios del CECC y las recurrencias locoregionales.

Las adenopatías cervicales posteriores y supraclaviculares conllevan un peor pronóstico en supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global (50).

En la figura 7 se puede observar como el número de ganglios linfáticos mostró una fuerte correlación con la respuesta.



**Fig 7: Número de ganglios linfáticos cervicales positivos como predictores de metástasis a distancia y SG a 5 años. Imagen de Mamelle y cols. (49)**

#### 1.6.2.5. Extensión extracapsular

La extensión extracapsular se produce en aproximadamente el 60% de los pacientes con ganglios cervicales positivos (51).

En el estudio de Pinsole y cols. encontraron una fuerte asociación entre la presencia de extensión extracapsular y el estadio N clínico (52), un 10,5% (18/171) de los pacientes N0 presentaron extensión extracapsular, un 35% (26/75) los pacientes N1, un 55 % (35/64) los pacientes N2 , y un 74% (20/27) los N3.

#### 1.6.3. Factores moleculares

Varios estudios correlacionan la mutación p53 con mayor resistencia a la radioterapia y quimioterapia (53, 54).

Al igual que en el caso de los polimorfismos, el análisis de metilación aberrante de los genes supresores tumorales supone una nueva aproximación al análisis de factores de resistencia a quimioterapia. La proteína p53 está implicada en la regulación negativa de la proliferación celular y de la supresión del fenotipo maligno. Una acumulación de la proteína p53 induce radioresistencia al reducir la apoptosis de células tumorales después del daño producido en el ADN por la RT.

La expresión de VEGF también se ha correlacionado mayores recurrencias locorregionales, metástasis a distancia y peores supervivencias (55).

En el meta-análisis de Kyzas y cols. encontraron que niveles altos de expresión de VEGF evaluados por inmunohistoquímica estaban correlacionados con 1,88 veces más riesgo de mortalidad a los 2 años (56).

Aunque la literatura sigue siendo un tanto contradictoria, se ha relacionado la amplificación de la ciclina D1 con mal pronóstico (57). En contraste, algunas evidencias sugieren que la sobreexpresión de ciclina D1 incrementa la sensibilidad de los tumores tratados con radioterapia y que en pacientes tratados con radiación primaria, la baja regulación de ciclina D1 puede correlacionarse con un mejor control locoregional, aunque se necesitan más estudios para caracterizar el efecto de los niveles de ciclina D1 con la radiosensibilidad (58, 59).

En pacientes con ganglios linfáticos cervicales negativos, la expresión o amplificación de la ciclina D1 en el tumor primario aumenta entre 4-8 veces el riesgo de metástasis cervicales (60, 61).

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el factor transformante de crecimiento-alfa (TGF- $\alpha$ ) se sobreexpresan frecuentemente en el CECC. Varios estudios han establecido la correlación entre la sobreexpresión del EGFR y un peor pronóstico y radioresistencia (62). En el estudio de Ang y cols. en una cohorte de 115 pacientes con estadio II-IV tratados con radioterapia, los pacientes que presentaban sobreexpresión de EGFR fueron asociados con un peor control locoregional, SLP y SG (63). La evidencia acumulada sugiere que la sobreexpresión del EGFR o la amplificación del gen se asocia con mal pronóstico.

Existen numerosos estudios que correlacionan el VPH-positivo con una mayor supervivencia, mejor respuesta a la radioterapia, e incluso mayores tasas de respuesta a la inducción quimioterápica (64). Dos estudios recientes sugieren que pacientes con cáncer oral VPH-positivos presentan una menor incidencia de segundos tumores primarios cuando se comparan con los VPH-negativos, un 0-2,2% vs 10,2-13%, respectivamente (65, 66).

## 1.7. Tratamiento

### 1.7.1. Cirugía

La cirugía fue el primer tratamiento que se dispuso para los pacientes con CCC, la primera laringectomía data de 1873. Al principio las cirugías eran muy mutilantes, se basaban principalmente en la extirpación del órgano.

El tratamiento del CCC está marcado por los avances en el tratamiento quirúrgico para la preservación del órgano y mejorar la calidad de vida de los pacientes. Las técnicas de reconstrucción para restaurar la función y la estética deben tenerse en cuenta en la fase de planificación quirúrgica. Entre las opciones quirúrgicas está la cirugía parcial convencional transcervical y la microcirugía transoral láser. En contraste con la resección quirúrgica abierta tradicional, los procedimientos endoscópicos proporcionan excelentes resultados oncológicos, preservando el habla y la función de deglución (67, 68).

El sistema quirúrgico daVinci® se utiliza actualmente en la cavidad oral, orohipofaríngea, laringe, parafaríngeo y regiones tiroideas, tanto para las enfermedades benignas como malignas (69, 70).

La técnica del ganglio centinela, permite hacer vaciamiento ganglionar más selectivo, y según su estadio, reducir efectos secundarios de la intervención y acelerar la recuperación del paciente. Esta técnica consiste en inyectar un isótopo radiactivo que permite detectar los ganglios en los que se produce el drenaje de la zona tumoral para después determinar de manera intraoperatoria si está infiltrado por células cancerosas. Esta técnica se ha implementado en nuestro hospital el presente año.

## 1.7.2. Radioterapia

Las técnicas de irradiación han experimentado grandes mejoras que han convertido el tratamiento de los tumores de cabeza y cuello en uno de los tratamientos más precisos y complejos de la actualidad. Dicha complejidad viene determinada por las altas dosis requeridas para obtener un buen control locorregional y por la proximidad de los órganos sanos que los limitan (71, 72).

### 1.7.2.1 Técnica 2 D

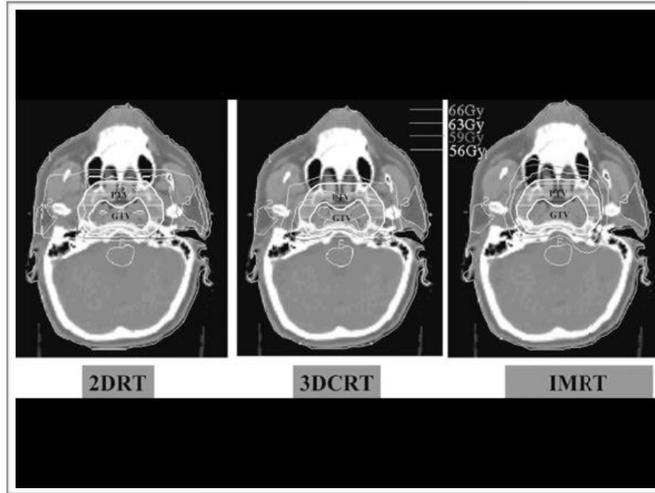
Son técnicas donde la información del contorno del paciente para el cálculo de dosis se extrae de varias imágenes de dos dimensiones (radiografías) que nos permiten localizar la zona de tratamiento y determinar el tamaño del campo de irradiación para cada caso según las regiones de riesgo. Actualmente esta técnica está en desuso.

### 1.7.2.2 Técnica 3D

Es la técnica estándar en la mayoría de los centros. Se empezó a utilizar a partir del desarrollo de las técnicas de adquisición de imágenes tridimensionales, como la tomografía computarizada (TC). Se utiliza la información del contorno tridimensional adquirida por una TC, así como la fusión con otras imágenes diagnósticas (TC con contraste o resonancia magnética), para definir las zonas de enfermedad macro (GTV) y microscópicas (CTV) así como los órganos de riesgo adyacentes según la anatomía individual de cada paciente permitiendo una delimitación de volúmenes más precisa.

### 1.7.2.3 IMRT

Esta técnica de radioterapia con intensidad modulada implica el uso de varios campos, cada uno con una intensidad modulada especificada mediante una matriz de subhaces de diferente fluencia. Con esta técnica se obtiene mayor conformación en la distribución de la dosis, permitiendo una mejor cobertura de los volúmenes de tratamiento y una mayor protección de los órganos adyacentes de riesgo. La administración del tratamiento es más larga y compleja, debido a la utilización consecutiva de pequeños campos para originar las diferentes fluencias en la dosis administrada.



**Fig 8: Comparación de las distribuciones de dosis según las diferentes técnicas de radioterapia. Imagen de Giralt y cols (73).**

Los parámetros más desfavorables para tener una recurrencia locorregional después del tratamiento con sólo cirugía son la extensión extracapsular y los márgenes positivos. En el estudio de Huang y cols. comprobaron que era mayor la SG y la SLE en los pacientes que recibieron radioterapia adyuvante que los que fueron tratados sólo con cirugía (71). Tras conocer la necesidad de un tratamiento complementario en los pacientes con extensión estranodal o márgenes positivos, se realizó un estudio randomizado en pacientes clasificados con alto o bajo riesgo de recaída para determinar la dosis de radioterapia óptima. Se llegó a la conclusión de que en pacientes de bajo riesgo eran suficientes 57,6 Gy y para pacientes de alto riesgo 63 Gy.

Los principales efectos secundarios de la radioterapia en estos pacientes son:

- *Agudos*: mucositis, infecciones (bacterianas, fúngicas y víricas), alteración en la salivación, disfagia, disgeusia, dolor, epitelitis, fatiga, desnutrición, alopecia parcial.
- *Crónicos*: xerostomía, osteo-radionecrosis, infecciones, cronificación de los efectos secundarios agudos.

El tratamiento de soporte incluiría las medidas preventivas tomadas antes del inicio de la radioterapia y el tratamiento sintomático de los efectos secundarios.

Como medidas preventivas más importantes: adecuada higiene bucal, extracción de piezas dentales en zonas de dosis altas, hidratación cutánea diaria y un buen control nutricional.

### 1.7.3. El papel de la quimioterapia

La cirugía y la radioterapia (RT) son las armas terapéuticas clásicas empleadas en el tratamiento locorregional de las neoplasias de cabeza y cuello. En líneas generales, en tumores pequeños (generalmente T1 y T2), ambas modalidades de tratamiento pueden considerarse igual de eficaces, optando por una u otra en función de diferentes factores, fundamentalmente la localización tumoral y la experiencia del centro. En tumores de mayor volumen, por el contrario, suele ser necesario la combinación de ambas modalidades.

En 1996 se publicó un meta-análisis (74) con 42 ensayos prospectivos que valoraban el papel de la quimioterapia en el CCC localmente avanzado tanto resecable como irresecable, en el que se objetivó que la adición de la quimioterapia al tratamiento con RT reducía la tasa de mortalidad un 22% y aumentaba la toxicidad (RR 2,17; IC 95%:1,84-2,56; p=0,001).

Clásicamente, el tratamiento considerado estándar en CCC localmente avanzado resecable ha sido la cirugía seguida de radioquimioterapia (RQT) complementaria. Los estudios más recientes, con un importante tamaño muestral y que emplean cisplatino (CDDP) a dosis de 100 mg/m<sup>2</sup> los días 1, 22 y 43 de RT, han sido llevados a cabo por la EORTC y el RTOG, y han mostrado también beneficios significativos a favor del tratamiento adyuvante combinado. En el primero de ellos EORTC 22931 con 334 pacientes, la administración de RT y CDDP concomitante incrementó de forma significativa la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG) a cinco años (53% vs. 40%; p=0.02), alcanzando también un mejor control locorregional (LC); todo ello a expensas de mucha más toxicidad aguda, especialmente en forma de mucositis (75). El segundo ensayo RTOG 9501 se llevó a cabo en 459 pacientes, con una mediana de seguimiento de 45.9 meses, y un LC superior para el tratamiento combinado, al igual que la SLE (HR=0.78; p=0.04), mientras que existió una tendencia no significativa a una mejor SG (HR=0.84; p=0.19), de nuevo, con más toxicidad aguda en los pacientes con tratamiento combinado (76).

Como ya se ha comentado, el tratamiento quirúrgico del CCC localmente avanzado resecable conlleva importantes secuelas físicas y funcionales para los órganos encargados de la

fonación y la deglución. Es por ello que se han desarrollado diversas estrategias para lograr la preservación de órganos. El estudio más importante, el estudio RTOG 91-11 no sólo comparó el valor del tratamiento con quimioterapia asociada a RT frente a RT sola en la preservación de órganos, sino también la mejor secuencia de administración de la misma. Los tres brazos del estudio, en el que se incluyeron 547 pacientes con cáncer glótico y supraglótico, consistieron en RT sola frente a tres ciclos de quimioterapia de inducción con CDDP y 5 fluorouracilo (5-FU) seguidos de RT frente a RQT concomitante con CDDP (77). La tasa de preservación de laringe a dos años fue superior en aquellos pacientes que recibieron RQT concomitante, mientras que la SG a los cinco años fue similar en todos los grupos (alrededor del 55%). La toxicidad de la RQT concomitante fue significativamente superior que en los otros dos grupos de tratamiento (78). A pesar de mantenerse una mayor preservación de laringe en el grupo de tratamiento concomitante, se observó como la supervivencia libre de laringectomía total y SLE se igualan entre los dos grupos con quimioterapia.

En cuanto al CCC localmente avanzado irresecable existen varias opciones terapéuticas como el papel de la RQT o el de la quimioterapia de inducción al tratamiento radical. La asociación de RQT concomitante se ha evaluado en distintos regímenes en diversos ensayos. De forma global, en el meta-análisis de Pignon (36) se demuestra un importante incremento de la supervivencia en los pacientes con CCC localmente avanzado que recibieron el tratamiento combinado. El análisis actualizado cuenta ya con 87 ensayos y 17.858 pacientes que evalúan tratamiento locorregional exclusivo vs. tratamiento locorregional más alguna modalidad de quimioterapia. Globalmente el uso de quimioterapia produce una reducción de la mortalidad absoluta a cinco años del 5%, mientras que la reducción de mortalidad con RQT concomitante a cinco años es del 8% (HR=0.81;  $p<.0001$ ). Si se restringe el análisis a los pacientes tratados con CDDP el beneficio absoluto se eleva al 11%. Este beneficio es independiente de las localizaciones tumorales, estadios III o IV y tipo de RT.

Sin embargo y pese a todo, los resultados con la RQT basada en cisplatino siguen siendo pobres en parte por las elevadas toxicidades agudas que presentan dichos tratamientos especialmente las toxicidades agudas en forma de mucositis que se presenta, según las series, hasta en un 80% de los casos y en grados 3 y 4 entre un 30% y 50% de los pacientes. Estas toxicidades condicionan el correcto cumplimiento de los tratamientos radicales y ocasionan hasta un 9% de muertes agudas secundarias al tratamiento con RQT (79). Así mismo las

toxicidades tardías en forma de disfonía, alteraciones en la deglución, xerostomía y los malos resultados estéticos ocasionan una importante comorbilidad que merma la calidad de vida de este tipo de pacientes y condicionan tratamientos oncológicos posteriores en los casos de recidiva. Este hecho se ve agravado por una escasa investigación en este grupo de tumores y con resultados en la mayoría de los casos desalentadores.

En la última década sólo 2 fármacos se han añadido a la batería disponible contra el CCC: Cetuximab, (un anticuerpo monoclonal frente el EGFR) y docetaxel. El estudio de Bonner fase III con 424 pacientes, comparó RT a altas dosis sola o RT más cetuximab en pacientes con CCC localmente avanzado irreseccable. La toxicidad fue similar en ambos brazos salvo en el caso de reacciones cutáneas, más frecuentes con cetuximab. La supervivencia fue superior en el brazo de cetuximab (mediana: 49 vs. 29 meses) así como el control LC (mediana: 24 vs. 15 meses) y con menos toxicidad (80). El estudio fase III EXTREME, en enfermedad metastásica ha puesto de manifiesto que la asociación de QT basada en platino y fluorouracilo con cetuximab, conseguía mejorar la tasa de respuesta, SLP y SG, añadiendo muy poca toxicidad a la producida por la combinación de platino y fluorouracilo sola. Es la primera vez en 30 años de estudios aleatorizados en primera línea de enfermedad recurrente y metastásica que se consigue un impacto significativo en la supervivencia (81).

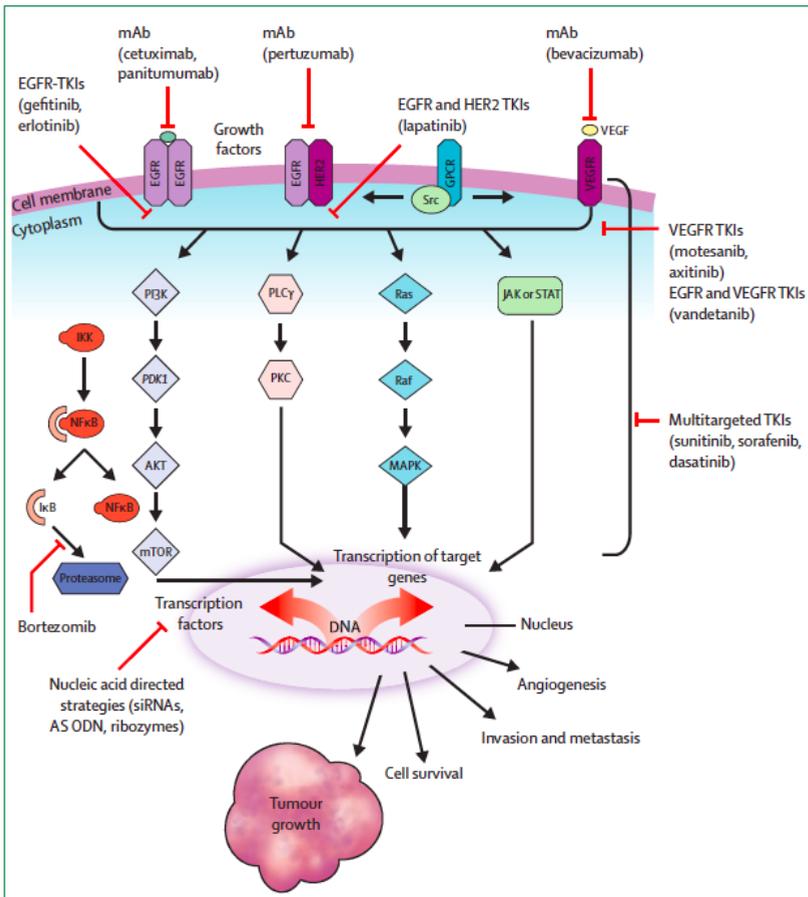
El papel de los taxanos en la quimioterapia de inducción también ha demostrado beneficio. El primero y más importante, el estudio EORTC 24791, comparó dos esquemas de quimioterapia antes de RT. Se randomizaron a 358 pacientes a recibir CDDP/5-FU vs. CDDP/5-FU/docetaxel. El estudio mostró la superioridad del triplete en términos de respuesta (54 frente a 68%; RC: 6,6% frente a 8,5%), tiempo hasta la progresión y SG con una reducción del riesgo de muerte del 27% (82).

Tabla 6: Principales estudios en CECC localmente avanzado

Estudio	N	Tratamiento	Objetivo primario	Respuesta al tratamiento
EORT 22931	334	• RDT • RDT+C (100 mg/m <sup>2</sup> ) d 1,2,2,4,3	SLP	SLP a los 5 años 36% vs 47%, SG 5 años 40% vs 53%
RTOG 95-01	416	• RDT • RDT+C (100 mg/m <sup>2</sup> ) d 1,2,2,4,3	CL	HR 0.72, 95% CI 0.48–1.06; p=0.08
ARO 96-3	444	• RDT • RDT+C (20 mg/m <sup>2</sup> ) + F (600 mg/m <sup>2</sup> )	CL	A los 5 años 61,9% vs 88,3%, SG 48,6% vs 58,1%
GORTEC 94-01	222	• RDT • RDT+CB (70 mg/m <sup>2</sup> ) d1-4 + F (600 mg/m <sup>2</sup> ) x3	SG	A los 3 años 31% vs 51%, a los 5 años 15,8% vs 22,4%
INTERGROU P THE HEAD & NECK	295	• RDT • RDT+C (100 mg/m <sup>2</sup> ) d1,2,2,4,3 • RDT + C (75 mg/m <sup>2</sup> ) d 1+F (1000 mg/m <sup>2</sup> ) d 1–4	SG	A los 3 años 23% vs 37% vs 27%
VALCSG	332	• CIRUGÍA→RDT • C (100mg/m <sup>2</sup> , d1)+F (1000mg/m <sup>2</sup> ,d q-5) x3→RDT	supervivencia / preservación de la laringe	64% preservación de órgano en brazo de QT. No diferencias en SG
EORT 24891	194	• CIRUGÍA→RDT • C (100mg/m <sup>2</sup> , d1)+F (1000mg/m <sup>2</sup> ,d q-5) x3→RDT	Eficacia	42% preservación de la laringe a los 3 años y del 35% a los 5 años. SG 57% vs 43% a los 3 años
GETTEC	318	• Cirugía o RDT o ambos • C (100mg/m <sup>2</sup> , d1)+F (1000mg/m <sup>2</sup> ,d q-5) x3→ Cirugía, RDT o ambos	SG	La media de supervivencia fue 3,3 vs 5,1 años
GSTTC	237	• Cirugía o RDT o ambos • C (100mg/m <sup>2</sup> , d1)+F (1000mg/m <sup>2</sup> ,d q-5) x3→ Cirugía, RDT o ambos	SG	En no resecables, SG a los 5 años 8% vs 21% y a los 10 años 6% vs 16%. No diferencias en resecables
Vermorken y cols.	358	• D (75 mg/m <sup>2</sup> d 1)+C (75 mg/m <sup>2</sup> , d 1)+F (750 mg/m <sup>2</sup> ci, d 1–5) every 3 weeks for 4 cycles followed by radiotherapy	SLP	Media de SLP 11 Vs 8,2 meses (p=0,007) SG 3 años 37% vs 26% (p=0,02)
Hitt y cols.	382	• P (175 mg/m <sup>2</sup> d 1)+C (100 mg/m <sup>2</sup> , d 2)+F (500 mg/m <sup>2</sup> ci, d 2–6) every 3 weeks for 3 cycles	Tasa de RC	33% vs 14%, p< 0.001. SG a los 2 años 66.5% vs 53.6% P=0.06

Cuando se comparan estos resultados con los presentados por otros tumores como la mama, el colon o incluso el pulmón queda patente los escasos avances en el tratamiento de los CCC. Por todo ello una de las estrategias principales que se persigue en el tratamiento de CCC es el de disminuir las toxicidades y comorbilidades resultantes del tratamiento oncológico. Los avances en este campo son de vital importancia para poder reconocer aquellos pacientes que más se podrían beneficiar de un tratamiento radical con radioquimioterapia basada en CDDP y discriminar a aquellos pacientes donde el alto riesgo de toxicidades por el tratamiento aconsejarían otro abordaje terapéutico.

Actualmente se están investigando (83) en el CECC nuevos métodos de tratamiento como la inmunoterapia y la terapia molecular dirigida, ver figura 9.



**Fig 9: Vías moleculares de señalización y nuevos agentes para el tratamiento del CECC. Adaptado de Argiris y cols. (82)**

## 2. Farmacogenética

La farmacogenética es una disciplina que trata de predecir, de acuerdo con un determinado perfil genético del paciente, la eficacia y la toxicidad de un fármaco o de una combinación. Existe una gran heterogeneidad en lo que respecta a la respuesta individual, no sólo en términos de eficacia terapéutica, sino en la toxicidad de los esquemas de tratamiento. En la práctica clínica puede contribuir a seleccionar los pacientes que más se beneficien de una estrategia y ofrecer una alternativa a aquellos en los que se espere una toxicidad inaceptable o falta de eficacia. La investigación farmacogenética ha ofrecido información relevante para identificar algunos factores de riesgo genómicos que predisponen a determinados individuos a presentar eventos adversos severos inducidos por la exposición a antineoplásicos. En la actualidad se han ido produciendo algunos cambios favorables a partir de la información más consistente de diversos estudios como la inclusión en la ficha técnica del medicamento de recomendaciones genéticas.

El papel de la farmacogenética para optimizar el tratamiento radical con radioquimioterapia basada en platino es fundamental dada la escasa investigación en lo referente a nuevas terapias en CCC donde las dianas terapéuticas que han sido útiles en otros tumores de histología similar, cáncer de pulmón de célula pequeña de tipo escamoso principalmente.

Actualmente, muchos de los estudios de marcadores de quimiorresistencia se centran en los factores genéticos y epigenéticos relacionados con la respuesta al cisplatino. Los polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) son una variación en la secuencia de ADN que ocurre cuando un único nucleótido (A,T,C o G) difiere entre miembros de la especie teniendo la clase más infrecuente al menos una frecuencia del 1%. Los SNPs pueden estar en secuencias que codifican genes o en regiones intergenéticas, pudiendo producirse diferentes respuestas a enfermedades, fármacos y RT, aunque no suelen estar en ellas, lo que no invalida su uso como biomarcadores de respuesta. Los SNPs están siendo cada día más estudiados en su relación con las radiaciones ionizantes. La reparación a nivel molecular de las lesiones causadas en el ADN por la RT (84), es otra vía de investigación aplicada en el campo de los agentes físicos o químicos, para evitar la transmisión de alteraciones génicas en las divisiones celulares y cuando la reparación no sea posible, se activen los mecanismos de apoptosis celular.

## 2.1 Agentes platinados

Los agentes derivados del platino ejercen su citotoxicidad de forma similar a los agentes alquilantes aunque el mecanismo preciso no se conoce. Producen enlaces intrahebra o entre las dos hebras del ADN (conocidos como aductos), sobre todo en islas CpG (regiones donde existe una gran concentración de pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos) Estos enlaces resultan de la formación de uniones covalentes entre el complejo activo platinado y determinadas bases de la secuencia del ADN, lo que lleva, en último término, a la apoptosis. De hecho, el grado de citotoxicidad que ejercen este tipo de compuestos, se correlaciona con la unión al ADN, concretamente, las lesiones citotóxicas provocadas por el Oxaliplatino ocurren mayoritariamente por las uniones intracatenarias con dos guaninas adyacentes o próximas de forma similar a las que realiza el cisplatino. Otros aductos incluyen enlaces intracatenarios entre dos bases guanina-adenina adyacentes y enlaces entre guaninas de hebras opuestas del ADN. No obstante, estas uniones representan menos de un 5% del total de aductos generados. Los enlaces que el platino forma con el ADN causan la inhibición de la síntesis del mismo, interfieren en los procesos de transcripción e inhiben la reparación. Activan las vías de transducción de señales que desencadenan la apoptosis y finalmente la muerte celular. Este hecho, además, parece ser independiente de la fase del ciclo celular en que se encuentre la célula.

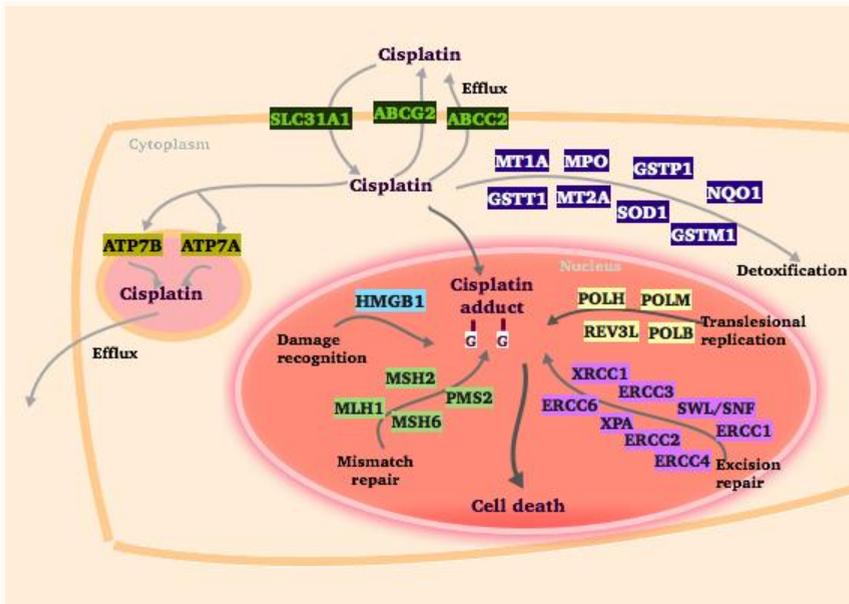


Fig 10: Ruta metabólica del cisplatino. Fuente:Elaboración propia

A pesar de las similitudes obvias en el tipo de lesiones que provocan, existen diferencias estructurales significativas tanto en el tipo como en la frecuencia de lesiones que ocasionan el Oxaliplatino y otros derivados del platino. A concentraciones equimolares, el Oxaliplatino genera un menor número de aductos ADN-platino pero presenta una toxicidad similar a los otros compuestos<sup>9</sup>. Además, las uniones que se generan ocurren mucho más rápido (15 minutos en el caso del Oxaliplatino versus 12 horas para el cisplatino). Los cruzamientos intrahebra provocan la transcripción de genes supresores de tumores, como p53, que llevan a la célula a apoptosis mediada por la activación de cascadas de quinasas. Estos depósitos de platino también favorecen la reparación del ADN por la enzima detoxificante Glutacion-S-Transferasa  $\pi$ -1 (GSTP1). Además, GSTP1 se une activamente al platino y contribuye a su eliminación del citosol.

El daño en el ADN inducido por derivados del platino produce una parada transitoria del ciclo celular en fase S, por medio de la inhibición de algunas ciclinas.

Este daño detiene de forma prolongada el ciclo celular en fase G2/M. Dicha parada del ciclo es necesaria para activar la ruta de reparación por excisión de nucleótidos (NER), donde actúan enzimas reparadoras como Xeroderma pigmentosum tipo D (XPD) y sólo cuando esta reparación es incompleta y el daño es mayor, la célula sufre apoptosis. Por consiguiente, las células tumorales que tienen p53 mutado hacia una pérdida funcional son más sensibles a estos fármacos derivados del platino (85).

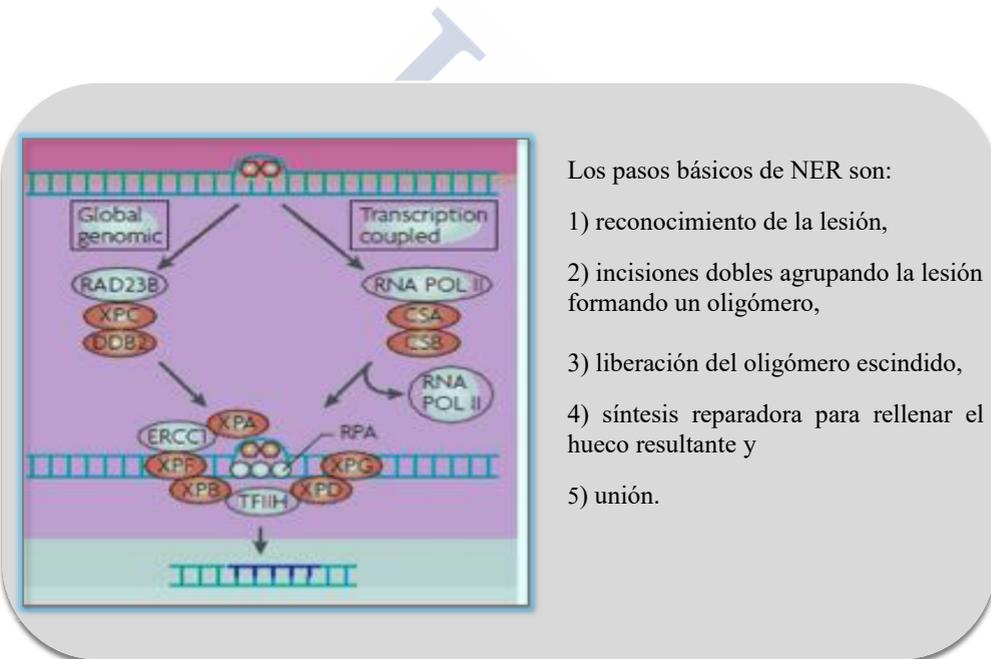
Existen múltiples mecanismos de resistencia de las células cancerosas relacionados con agentes de platinos, entre los que destacamos (86):

- Descenso en la acumulación del fármaco.
- Inactivación del fármaco por niveles incrementados de glutatión (conjugación) o de la metalotioneína (secuestro).
- Defectos en el sistema de reparación por escisión de bases.
- Incremento en el sistema de reparación por escisión de nucleótidos de los aductos del ADN.
- Defectos en el sistema de reparación del ADN (Mismatch Repair System) e incremento en el *bypass* replicativo son mecanismos de resistencia asociados a cisplatino y carboplatino.

## 2.2 Mecanismos básicos de reparación del ADN

### 2.2.1 Vía Nucleotide Excision Repair

La vía *Nucleotide Excision Repair* (o NER) parece ser una vía clave de resistencia o sensibilidad a agentes de platino por su papel fundamental en la capacidad reparadora del ADN y por tanto en la eliminación de los aductos del platino sobre el ADN. Repara lesiones voluminosas del ADN que distorsionan la estructura de la doble hélice del ADN, estas lesiones se forman por exposición a radiación ionizante o a agentes intercalantes del ADN como es el cisplatino.



**Fig 11: Esquema del mecanismo de reparación NER. Imagen adaptada de Bartek y cols.**

La NER se puede subdividir en reparación del genoma global y reparación acoplada a la transcripción dependiendo si las lesiones del ADN afectan las cadenas transcritas de los genes expresados (87).

El mecanismo de actuación de este sistema de reparación no está totalmente claro, pero se sabe que requiere la formación de un complejo entre XPC (proteína que es esencial para NER) y RPA (proteína de unión a ADN monocatenario) con la región lesionada.

TFIIH separa las dos hebras de ADN de la región afectada mediante la actividad de las helicasas XPB y XPD. Las proteínas RPA y XPA estabilizan la región de ADN abierta y atraen a las nucleasas XPG y XPF-ERCC1, que cortan la hebra de ADN dañada por los extremos 3' y 5' respectivamente liberando el fragmento de ADN dañado. Por último, se sintetiza y se une el fragmento de ADN que falta mediante la actividad de las enzimas polimerasa y ligasa.

Dentro de esta vía los genes ERCC1 y XPD son cruciales en la capacidad de reparación del ADN y también, por tanto, en la respuesta a los tratamientos basados en agentes de platino. En dos estudios (88, 89) realizados en una muestra de aproximadamente 100 pacientes, una baja expresión del gen ERCC1 se ha relacionado con una mejor respuesta a la RQT basada en platino en estadios tempranos de CCC, lo que implica un papel del ERCC1 en la reparación del daño en el ADN inducido por QRT. Una alta expresión de ERCC1 predice un peor control locoregional (90) en un reciente estudio realizado en 258 pacientes.

Otro gen fundamental en la vía de reparación NER es el XPD. Diversos estudios han demostrado que los pacientes portadores de las variantes homocigotas Gln751XPD presentan un menor tiempo a la progresión y supervivencia en relación a los portadores del alelo Lys751XPD cuando son tratados con dobletes basados en cisplatino.

### 2.2.2 Vía Base Excision Repair

La vía **Base Excision Repair** (o BER) repara la base dañada y las rupturas de una sola hebra en el ADN causadas por radiaciones ionizantes y agentes alquilantes. La BER se puede subdividir en dos subvías metabólicas según la longitud de sus sustratos de reparación: BER de parche corto que repara sólo lesiones de bases únicas y BER de bases largas que repara lesiones de 2-13 bases de un único sitio (91).

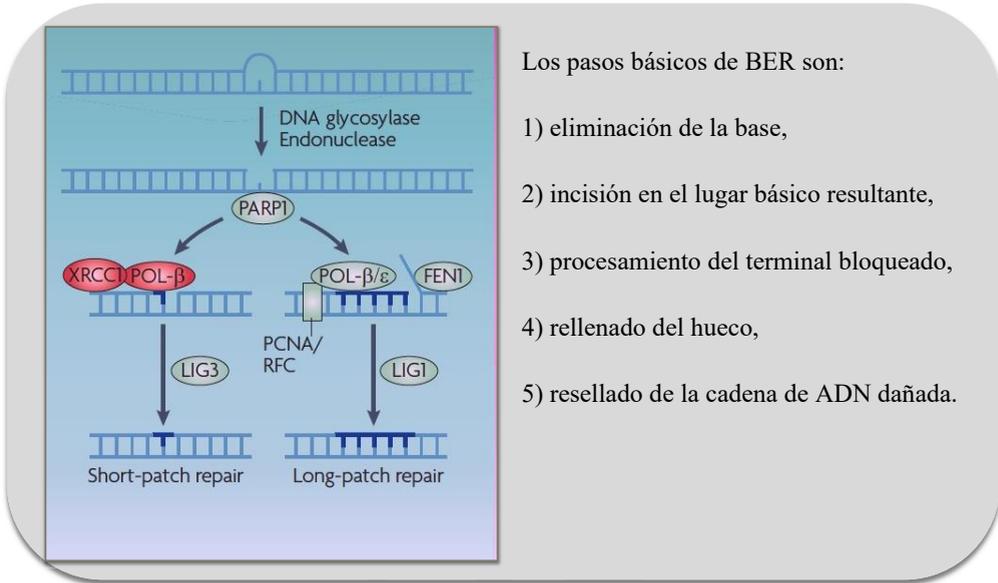


Fig 12: Esquema del mecanismo de reparación BER. Imagen adaptada de Bartek y cols (92).

La identificación de la lesión se produce a través de una ADN glucosilasa y es procesada más tarde por la endonucleasa APE1. Tras la fragmentación de la unión fosfodiéster, la reparación de la lesión se puede realizar por distintas vías. En la BER de parche corto PARP1 actúa como sensor de rotura de cadenas para unir las a la mella, a continuación PARP1 recluta la ADN polimerasa beta (POLβ) que interactúa con el complejo heterodímero de XRCC1-ADN ligasa 3 para resintetizar un único nucleótido en el lugar de la lesión.

XRCC1 actúa como proteína estabilizadora permitiendo la unión de la polimerasa y la ligasa al sitio de reparación. En la BER de parche largo, las POL replicativas delta/ epsilon con PCNA como complejo de sujeción de carga se utilizan para resintetizar un oligonucleótido largo. La endonucleasa flap FEN1 remueve la región desplazada, evitando la formación de bucles durante la subsecuente síntesis de ADN y la proteína PCNA estimula estas reacciones estabilizando las diferentes proteínas. El resellado de la cadena de ADN dañada lo finaliza la ligasa 1.

Proteínas del sistema BER, como XRCC1, también participan en la reparación del ADN lesionado por radiaciones ionizantes. Obviamente variaciones (mutaciones o polimorfismos) en estas proteínas pueden condicionar la respuesta frente a la RT y otros agentes citotóxicos.

Estudios epidemiológicos demuestran una estrecha relación con polimorfismos de XRCC1 y susceptibilidad a padecer tumores de cabeza y cuello y respuestas a la RT junto con otros genes de reparación (XRCC4, XRCC3, XPC etc.). El polimorfismo XRCC1 Arg399Gln se encuentra en el área de codificación del sitio de unión de PARP. Los portadores de la variante alélica XRCC1 399 Gln han demostrado tener mayores niveles de aductos de ADN y mayor riesgo de sensibilidad a la radiación ionizante (93), también se ha encontrado una correlación entre el tabaco y el daño en el ADN (94). Tres estudios encontraron en una muestra relativamente grande (n= 103-279) que la variante alélica Gln de XRCC1-399 se asocia con una mayor OS y prolongación del tiempo hasta la recurrencia (95-97).

### 2.2.3 Vía Mismatch Repair

Vía de reparación de errores Mismatch Repair System (MMR) es el responsable de reparar los falsos apareamientos que se producen en el ADN debidos a errores en el proceso de replicación y recombinación del ADN o a las modificaciones que generan los agentes genotóxicos en determinados nucleótidos (98).

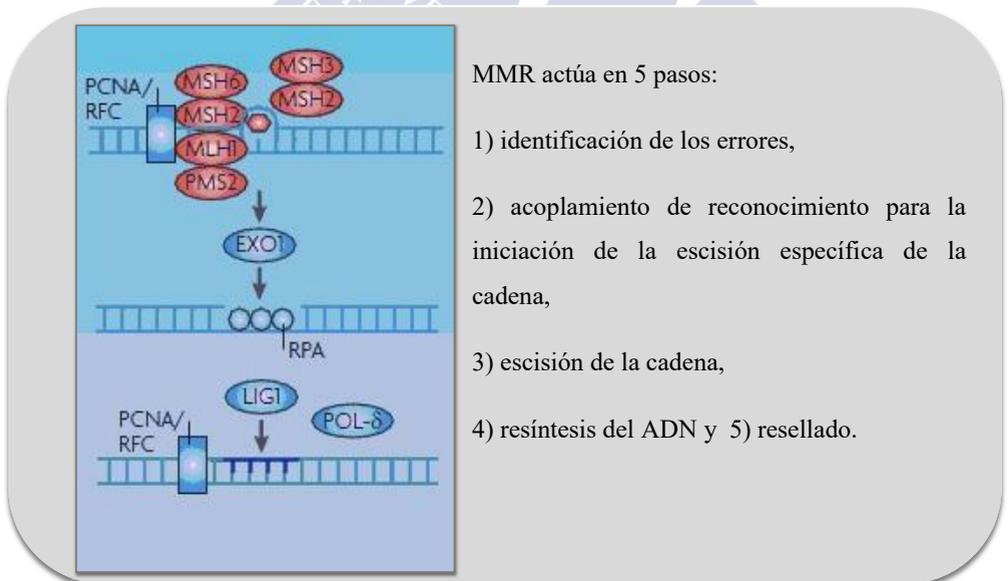


Fig 13: Esquema del mecanismo de reparación de errores MMR. Imagen adaptada de Bartek y cols (92).

El reconocimiento de pequeños lazos generados por la inserción o pérdida de nucleótidos al igual que por las incorporaciones erróneas de bases es realizado por un complejo denominado MUTS alfa, un heterodímero de MSH2 y MSH6. Otro heterodímero MUTS beta, que comprende el 10% del MSH2 celular y MSH3, igualmente reconoce la formación de estas estructuras aunque tiene una mayor afinidad por bucles externos. Aunque el mecanismo de reconocimiento y reparación MMR no está totalmente descrito, varios complejos proteicos que intervienen en este proceso han sido identificados, como MLH1, PMS2 y MLH3, que forman igualmente dos heterodímeros, MutLa y MutLb. Estos son reclutados al sitio de reparación tras interactuar con MSH2 y bajo la unión de ATP y/o hidrólisis. Adicionalmente otras proteínas implicadas en los subsecuentes pasos han sido identificadas: PCNA (proliferating cell nuclear antigen) actúa como enlace entre el complejo de MMR y la ADN polimerasa en la horquilla de replicación, posiblemente facilitando el reconocimiento y reparación de la nueva cadena. RFC (*replication factor C*) es un factor necesario para la unión de PCNA al ADN. Las exonucleasas EXOI/HEXI, FEN1 y las ADN polimerasas delta y epsilon interactúan con MSH2 dirigiendo la excisión de las secuencias erróneas.

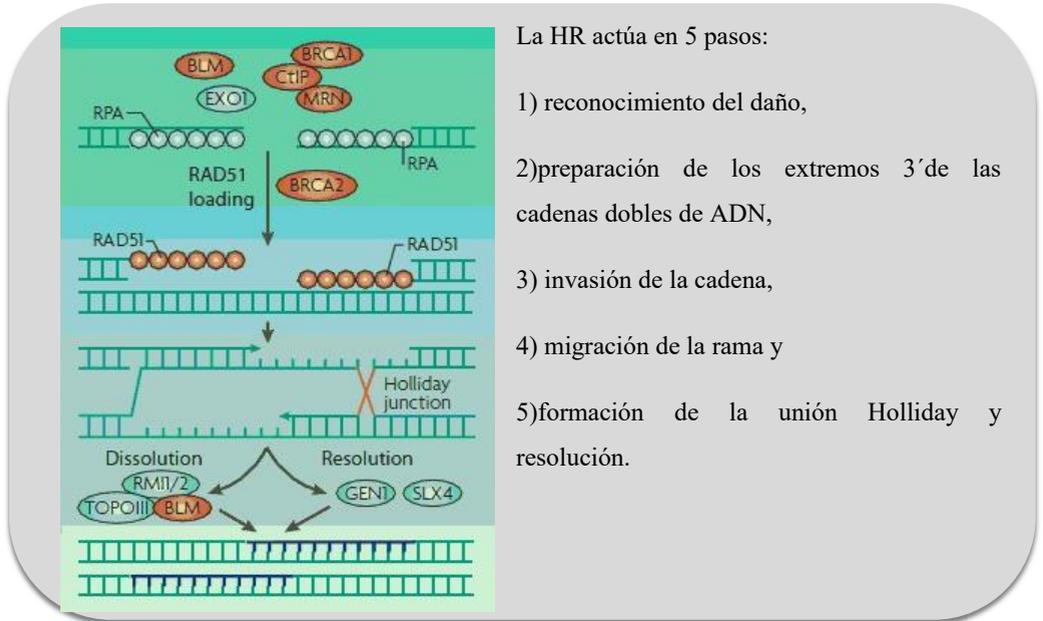
La exonucleasa 1 elimina el fragmento de ADN donde se encuentra la lesión y la POL delta sintetiza de nuevo el fragmento de ADN que se une a la cadena original a través de la actividad del enzima ligasa que sella las mellas para finalizar todo el proceso MMR (99).

La pérdida de actividad de MMR da lugar a la resistencia del tumor a agentes alquilantes como puede ser el cisplatino, y aunque el daño por radiación ionizante es reconocido por MMR, la citotoxicidad con bajas tasas de exposición de forma prolongada puede conferir a las células tumorales ser radioresistentes.

#### 2.2.4 Reparación por recombinación de roturas de la doble cadena

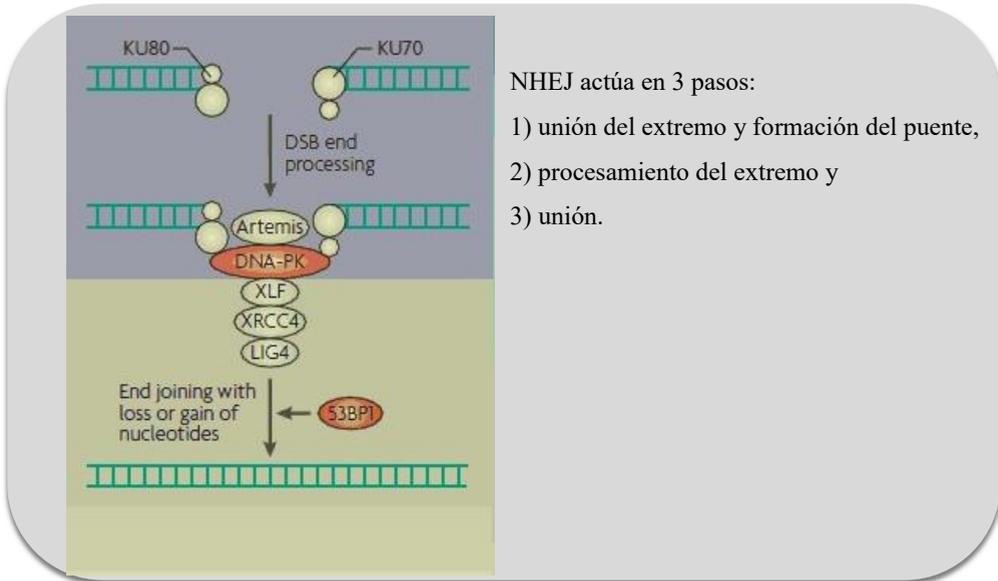
Entre las causas de estas roturas están las radiaciones ionizantes y algunos mutágenos químicos. La reparación de las roturas puede hacerse por unión de extremos no homólogos (NHEJ: Non-Homologous End Joining) o por recombinación homóloga (HR) en la que intervienen las mismas proteínas que en la recombinación genética. La HR promueve una reparación del daño de manera precisa, copiando la información intacta de una cadena de ADN molde homóloga no dañada; mientras que NHEJ es un mecanismo independiente de la homología que simplemente une extremos rotos. NHEJ es el mecanismo predominante

responsable de la reparación de la mayoría de las roturas dobles de cadena en las células somáticas.



**Fig 14:** Esquema del mecanismo de reparación de roturas por HR. Imagen adaptada de Bartek y cols (92).

Este sistema repara las roturas de doble cadena uniéndose por recombinación a la región de ADN dañado, el complejo Mre 11/Rad50/NBS1 (MRN) se agrupa para procesar los extremos del ADN roto y elimina parte de la secuencia de ADN en el sentido 5'-3'. Rad52 se une a los extremos 3' de ADN de cadena sencilla e interacciona con Rad51, que a su vez interacciona con RPA, y forma un heteroduplex con la misma región de ADN de la cromátida hermana. La invasión de la cadena y la migración de la rama son iniciadas por Rad51. Luego se forman dos uniones Holliday que son estructuras encadenadas de cuatro cadenas que pueden moverse a lo largo del ADN por un proceso de migración de la rama y en consecuencia, se extiende o encoge la región del heteroduplex de ADN. Finalmente estas uniones Holliday son escindidas por una resolvasa y deshace el heteroduplex obteniendo una nueva secuencia de ADN de doble cadena (100).



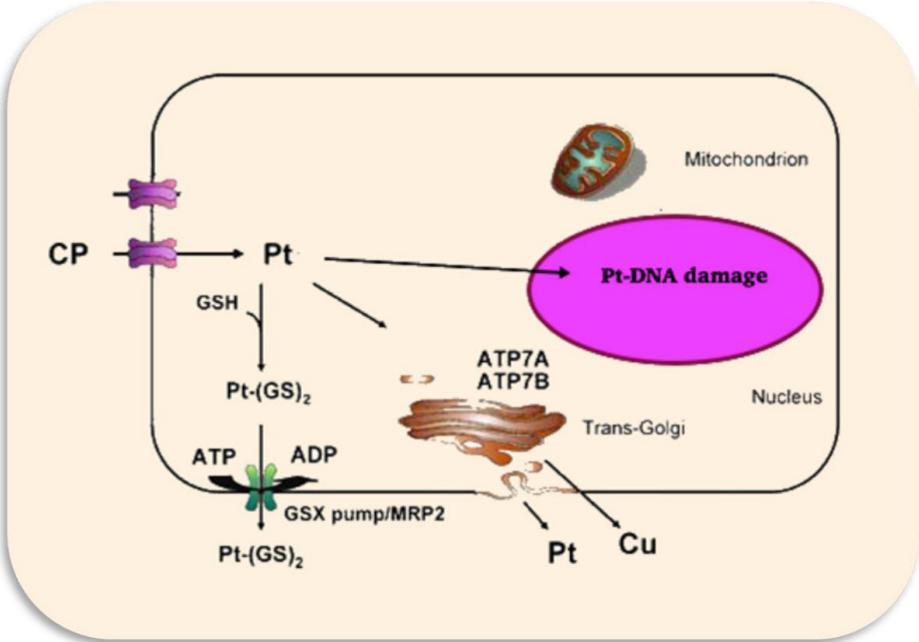
**Fig 15: Esquema del mecanismo de reparación de roturas por NHEJ. Imagen adaptada de Bartek y cols (92).**

NHEJ no requiere homología en los extremos terminales del ADN, el primer paso en la vía es la unión de ku70/ku80 a los extremos rotos evitando la pérdida de información genética. Durante NHEJ el heterodímero de unión de extremos terminales de ADN de las proteínas Ku70 y Ku80 activa la subunidad catalítica (ADN-PKcs) de la proteína quinasa dependiente de ADN (ADN-PK) estabilizando su unión con el ADN. El complejo ADN-PK se une a la nucleasa Artemio y estimula la unión y la ligación de los dos extremos de ADN a través de la actividad del complejo ligasa IV/XRCC4 (101).

### 2.3 Transportadores de membrana

Un importante mecanismo de resistencia a cisplatino es una disminución de la concentración eficaz de fármaco en la célula. El mecanismo de entrada a la célula no está totalmente dilucidado, se piensa que es a través de los transportadores de cationes orgánicos (OCTs), de la proteína transportadora de cobre CTR1 y de rutas endocíticas, en particular de macropinocitosis. En la salida celular de cisplatino tienen un papel relevante los transportadores de cobre ATP7B y ATP7A (a través de secuestro vesicular) además de

proteínas de multirresistencia a fármacos, participantes en la eliminación de xenobióticos, como la MRP2.



**Fig 16: Diagrama esquemático del transporte de cisplatino (CP).** El CP entra en la célula a través de hCTR1, el platino es entregado al ATP7A y ATP7B para ser exportado, el platino interactúa con el glutatión (GSH) para formar el complejo Pt-(GS)<sub>2</sub> y ser eliminado por MRP2 y otra fracción de platino entra en el núcleo y forma aductos ADN-Pt. Imagen adaptada de Kuo y cols (102).

ABC1 se caracteriza por su capacidad de conferir un fenotipo de resistencia múltiple a fármacos en células cancerosas. Esta resistencia a fármacos, como ya hemos visto anteriormente, puede producirse por diferentes factores como puede ser una disminución en la entrada del fármaco al interior de la célula, una elevada desintoxicación, alteración de las proteínas diana o una elevada secreción del fármaco. Esto puede llevar a la resistencia múltiple a fármacos (MDR), donde la célula es resistente a varios fármacos, lo que limita el tratamiento anticancerígeno. Los genes ABC juegan un papel importante en la MDR, de manera que, aunque la entrada de fármacos no se vea alterada por estas proteínas, sí se ve disminuida su acumulación en el interior celular.

En el caso de CTR1, que regula la entrada de cobre y cisplatino a la célula de manera competitiva, se ha demostrado que ciertas líneas celulares tumorales resistentes al fármaco expresan CTR1 de forma reducida. En el caso de los transportadores ATP7A y ATP7B, se ha demostrado que la sobreexpresión de estos en diversas líneas celulares produce resistencia a cisplatino (103).

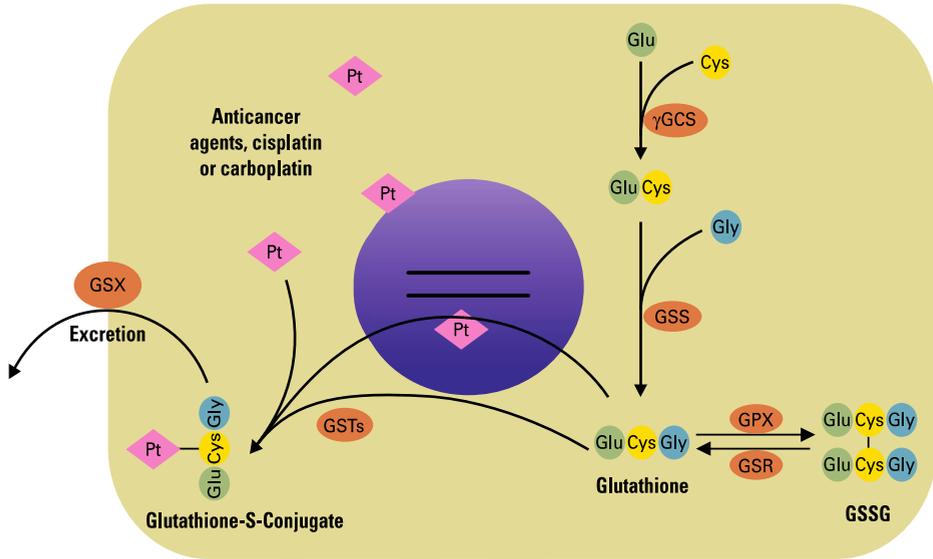
En el estudio de Nakayama y cols. realizado en 82 muestras de carcinoma de ovarios para analizar la expresión de varios genes de resistencia conocidos incluyendo ATP7B, MDR1, MRP1, MRP2, PRL y BCRP determinó que ninguno fue indicador de resistencia a cisplatino, salvo con la excepción de ATP7B (104). Los pacientes cuyos carcinomas expresaban altos niveles de ATP7B tuvieron un peor pronóstico que los pacientes que expresan bajos niveles de ATP7B en el tumor. Curiosamente, la sobreexpresión conduce a un mayor secuestro de agentes platinados y no a la disminución de acumulación total (104).

## 2.4 Detoxificación

Las glutatión S-transferasas (GSTs) desempeñan un papel importante en el metabolismo de los compuestos potencialmente genotóxicos mediante la prevención de daños en el ADN por formación de aductos (105).

Aproximadamente un 40% de los pacientes son resistentes a platino. Uno de los mecanismos implicados en esta ausencia de respuesta es la inactivación intracelular de cisplatino por glutatión. La isoenzima GSTP1 participa en la detoxificación de los derivados del platino, sobre todo del cisplatino, polimorfismos de la GSTP1, que es una de las cinco isoenzimas de la glutatión-S-transferasa, se han asociado con alteraciones en la actividad enzimática y con la sensibilidad a la quimioterapia basada en platino.

En el estudio de Booton y cols. a 108 pacientes se les realizó estudio genético de polimorfismos de GSTP1, y no se encontró relación entre los polimorfismos de GSTP1 y la respuesta al tratamiento ni la supervivencia global. Las tasas de neutropenia fueron menores en los pacientes portadores del alelo 105Val ( $p=0,020$ ) o del haplotipo GSTP1\*B ( $p=0,038$ ), aunque estos pacientes también demostraron una notable tendencia a responder peor a cisplatino y alcanzar una menor supervivencia (106).



**Fig 17: Mecanismo de detoxificación del platino. Imagen de Yang y cols (107)**

Duarte y cols. encontraron una asociación entre la ausencia del genotipo GSTM1 y el incremento del riesgo de desarrollar leucodisplasia en la cavidad oral (108).

La isoenzima GSTP1 participa en la detoxificación de los derivados del platino, sobre todo del cisplatino. Se han descrito también evidencias de una posible relación entre algunos transportadores o canales, como CTR1 (SLC31A), ATP7A, ATP7B y la concentración intracelular de platino (109).

### 3. Justificación del estudio

Los CECC representan el 5% de los cánceres diagnosticados de nuevo en el total de la población adulta. Se trata de una neoplasia maligna potencialmente curable, si se diagnostica en una etapa precoz, pero desafortunadamente dos tercios de los casos se diagnostican en una fase locorregional avanzada, estadios III y IV M0. A pesar de que en los últimos años ha habido avances importantes en el tratamiento de los CECC con la confirmación de la eficacia de los programas de radioquimioterapia con cisplatino (110), los CECC localmente avanzados irresecables tienen un pronóstico muy malo, con una mediana de supervivencia inferior a los

20-24 meses y sólo un 25-30% de pacientes vivos a los 5 años (111, 112). Un 60-70% de estos pacientes desarrollarán un fallo locorregional y un 20-30% metástasis a distancia.

El tratamiento de radioquimioterapia con cisplatino en el CECC localmente avanzado implica una elevada toxicidad, mucositis grave o amenazante para la vida hasta en un 50% de los pacientes, y otras complicaciones que ocasionan hasta un 9% de muertes agudas. Además, estas toxicidades condicionan el correcto cumplimiento de los tratamientos con intención curativa.

Con estos resultados es evidente que se debe hacer un esfuerzo para investigar, optimizar los tratamientos disponibles e integrar nuevas opciones terapéuticas en el tratamiento de los pacientes con CECC.

Los análisis farmacogenéticos son herramienta que permiten individualizar los tratamientos, y los análisis de interacción entre genes dentro de una misma vía pueden proporcionar resultados más comprensibles acerca de cómo las variantes polimórficas afectan a la eficacia o toxicidad del tratamiento.

Por ello nos planteamos la necesidad de validar de forma prospectiva polimorfismos genéticos publicados en la literatura, con patrones conocidos por su implicación como factores pronósticos o predictivos de toxicidad o respuesta al tratamiento con platino y radioterapia para seleccionar aquellos pacientes con elevado riesgo de toxicidad y pocas probabilidades de éxito terapéutico, a los que se les puede ofrecer otro abordaje terapéutico o inclusión en ensayos clínicos.



## **CAPÍTULO II**

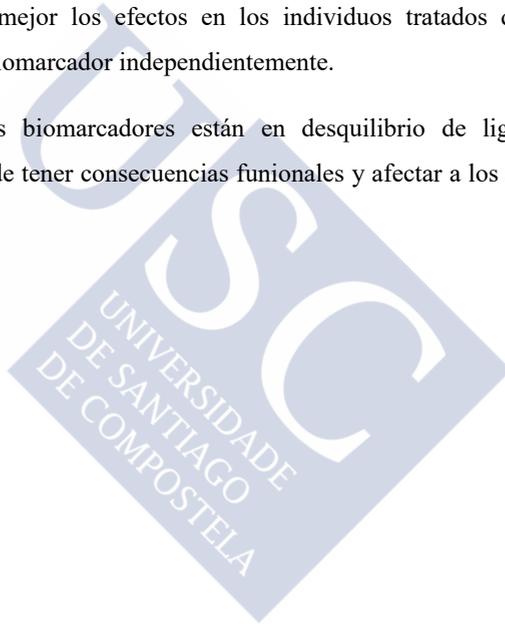
### **HIPÓTESIS**



En la literatura existen muchos marcadores farmacogenéticos que se han asociado con la toxicidad y eficacia en términos de respuesta y supervivencia. Aunque existen discrepancias entre los trabajos en cuanto a metodología y tamaño de muestra, y muchos resultados no se replican, cabe esperar que ni no todos, parte de los biomarcadores descritos explican las diferencias en cuanto a los efectos adversos y respuesta al tratamiento con cisplatino-radioterapia en pacientes con CECC, especialmente en una población homogénea como la nuestra y analizada de forma prospectiva.

Parte de los problemas de los estudios de asociación farmacogenética pueden derivarse de la interacción de genes distintos. El análisis de un gran número de biomarcadores y de sus interacciones explicaría mejor los efectos en los individuos tratados que la información proporcionada por cada biomarcador independientemente.

El hecho de que varios biomarcadores están en desequilibrio de ligamiento formando haplotipos concretos puede tener consecuencias funcionales y afectar a los análisis estadísticos de asociación.







**CAPÍTULO III**  
**OBJETIVOS**



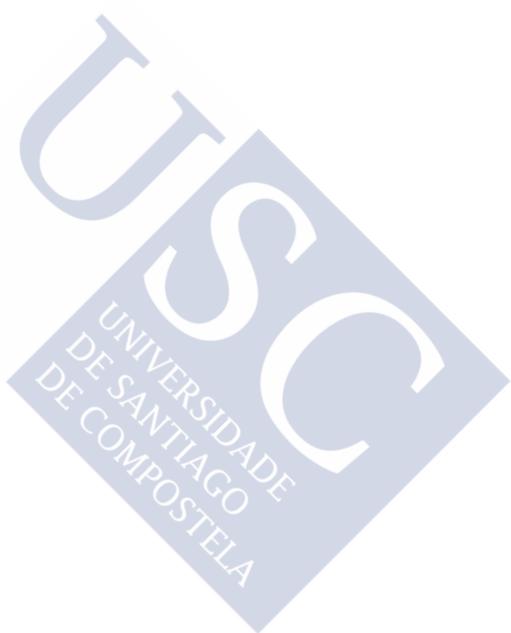
En el presente trabajo de investigación se plantearon los siguientes objetivos:

- Identificar genes candidatos publicados en la literatura capaces de predecir toxicidad y/o respuesta al tratamiento con cisplatino-radioterapia en pacientes con CECC.
- Evaluar en nuestra población de pacientes de forma prospectiva patrones de variabilidad de los polimorfismos y mutaciones seleccionadas.
- Analizar marcadores potenciales de sensibilidad y resistencia a cisplatino entre los polimorfismos de los genes de la ruta metabólica del platino, como genes reparadores del ADN, transportadores y genes detoxificantes.
- Comprender la correlación entre los genotipos de reparación del ADN y su relación con el fenotipo de respuesta a los tratamientos en términos de eficacia y toxicidad en pacientes de CECC.
- Determinar que variantes polimórficas en los genes de reparación del ADN pueden explicar las diferencias interindividuales en la supervivencia en pacientes tratados con cisplatino- radioterapia.
- Determinar la presencia de posibles interacciones génicas, así como de haplotipos en el caso de polimorfismos localizados en el mismo gen o cromosoma, con el fin de identificar variantes génicas que pudieran influir en la eficacia y toxicidad del tratamiento.
- Obtener un panel de biomarcadores farmacogenéticos en línea germinal que predigan con una sensibilidad clínica relevante el riesgo de toxicidad grave o amenazante para la vida, y la ausencia de eficacia del tratamiento combinado de cisplatino radioterapia en CECC.





**CAPÍTULO IV**  
**MATERIAL Y MÉTODOS**



## 4.1 Diseño, sujetos de estudio

Estudio prospectivo de 110 pacientes con cáncer de cabeza y cuello localmente avanzado a tratamiento con la combinación cisplatino- radioterapia en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela durante el período 2011-2014.

Criterios de inclusión:

- Pacientes mayores de edad diagnosticados de carcinoma escamoso de cabeza y cuello en estadios III-IVb de la enfermedad a tratamiento con quimioradioterapia concomitante con agentes platinados.
- Firma del consentimiento informado y confidencialidad de los datos personales y genéticos respetando en todo momento los principios éticos básicos de la investigación con muestras biológicas.

Criterios de exclusión:

- No recibir quimioterapia o radioterapia
- No firma del consentimiento informado.

Tras la firma del Consentimiento Informado se le extraía una muestra de sangre al paciente que era enviada a la Fundación Xenómica Galega donde se almacenaba a 4°C o congelaba hasta el momento de su procesamiento y análisis por el Centro Nacional de Genotipado (CeGen) en Santiago de Compostela.

Los pacientes fueron clasificados como casos y controles en función de la toxicidad y de la eficacia.

Para evaluar la toxicidad se utilizaron los Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) versión 4.0 del NCI, igualmente se agruparán como casos y controles aquellos individuos que desarrollaron o no toxicidad al tratamiento, haciendo un análisis global de todos las toxicidades en conjunto, así como, de forma estratificada considerando cada efecto por separado. En la eficacia, se incluyeron los individuos que respondieron o no al tratamiento según los criterios RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors).

Las categorías quedaron identificadas como: respondedores (controles) y, no respondedores (casos), al evaluar la eficacia y para la toxicidad, los individuos que no desarrollaron toxicidad (controles) y como casos todos los pacientes que desarrollaron alguna de las toxicidades observadas en nuestro estudio (mucositis, radiodermatitis, disfagia, neutropenia, trombocitopenia, leucopenia, anemia).

## 4.2 Aspectos éticos del estudio

Los oncólogos médicos informaron ampliamente a los pacientes sobre el estudio y su posible participación de forma voluntaria para lo cual sería necesaria la obtención del consentimiento informado aprobado por el CEIC de Galicia, firmado y fechado (ANEXO).

A cada uno de los pacientes a los que se les propuso participar en el estudio, se les entregó un documento escrito denominado Hoja de Información al paciente, que contenía la información relevante y necesaria para que el paciente pudiera decidir si deseaba participar en el estudio (ANEXO).

El paciente podía conocer sus resultados si así lo expresaba y retirarse voluntariamente del estudio. Se respetó en todo momento la confidencialidad de los datos personales y genéticos del paciente según los principios éticos básicos de la investigación con muestras biológicas.

## 4.3 Descripción de variables

El oncólogo médico, en el curso de la visita del paciente, recogió en la historia clínica electrónica mediante el programa IANUS:

- a) el estado funcional del paciente performance Status de la ECOG (PS)
- b) las toxicidades por cada ciclo de quimioterapia que luego fueron codificadas según las CTCAE como:
  - o Grado 1 = leve, asintomático o leves síntomas; sólo observaciones clínicas o diagnósticas; intervención no indicada.
  - o Grado 2 = Indicada intervención mínima, local o no invasiva; limitación de las actividades diarias instrumentales no imprescindible para ser funcionantes tales como cocinar, compras, uso de teléfono, manejo de dinero, etc.
  - o Grado 3 = Severo o clínicamente significativo pero no inmediatamente amenazante para la vida; indicado ingreso hospitalario o prolongación del mismo, incapacitante, limitación en las actividades cotidianas de cuidado personal, incapacidad para bañarse, vestirse y desvestirse, comer sin ayuda, uso de baño, toma de medicación pero no confinado en cama.

- o Grado 4 = amenazante para la vida o incapacitante: se precisa intervención médica urgente con objeto de mantener la supervivencia.
- o Grado 5 = muerte: acontecimiento adverso que causa la muerte

**Tabla 7: Toxicidades recogidas en el estudio según las CTCAE v4.0**

	GRADO 1	GRADO 2	GRADO 3	GRADO 4	GRADO 5
Anemia	valores normales-10 g/dl	<10.0-8.0 g/dl	<8.0-6.5 g/dl	<6.5 g/dl	Muerte
Neutrófilos	1.5-1.9 10e9/l	1.0-1.4 10e9/l	0.5-0.9 10e9/l	<0.5 10e9/l	
Leucocitos	3.3-3.9 10e9/l	2.2-2.9 10e9/l	1.9-1.0 10e9/l	<1.0 10e9/l	
Plaquetas	normal-75.0	50- 74.9	25.0-49.9	<25.0	
Mucositis	irritación o eritema indoloro	eritema, edema y/o úlceras dolorosas que permiten la ingesta oral	eritema, edema y/o úlceras que no permiten la ingesta de sólidos	necesidad de soporte enteral o parenteral (no tolerancia a líquidos)	
Disfagia	sintomática, capaz de comer dieta normal	sintomática, alteración al comer/ tragar	severa alteración al comer/tragar	severa alteración que necesita sonda u hospitalización	
Radiodermitis	eritema leve o descomposición seca	eritema moderado a brillante en descamación húmeda, confinada a pliegues, edema moderado	descamación húmeda confluyente, de diámetro >1.5 cm no confinada a pliegues	necrosis de la piel o ulceración del espesor total de la dermis	

- c) la evaluación de la respuesta al final del tratamiento codificada según los criterios RECIST es valorada mediante examen físico, endoscopia, tomografía computerizada y/o resonancia magnética nuclear.

**Tabla 8: Criterios RECIST v1.1**

Respuesta completa (RC)	Desaparición de todas las lesiones diana
Respuesta parcial (RP)	Reducción de al menos un 30% en la suma del diámetro mayor de todas las lesiones diana tomando como referencia la suma de diámetros mayores en visita basal.
Enfermedad estable (EE)	No se produce una reducción suficiente para calificarlo como RP ni un aumento suficiente para calificarlo como PE, es decir, un descenso de la suma del diámetro mayor de todas las lesiones diana inferior al 30% tomando la medición basal como referencia o aumento de este diámetro en menos de un 20% tomando como referencia la suma más pequeña de diámetros mayores desde el inicio del tratamiento.
Progresión de la enfermedad (PE)	Un aumento del 20% o mayor de la suma del diámetro mayor de todas las lesiones diana tomando como referencia la suma más pequeña de diámetros mayores desde que inició el tratamiento.

Se define índice de respuesta global como la tasa de respuesta (completa + parcial) medida según método RECIST.

Además de los datos antropométricos, demográficos, clínicos y genéticos, se recogieron por paciente: antecedentes de interés con fármacos, medicación actual, posibles interacciones farmacocinéticas entre la quimioterapia y otros medicamentos que reciba el paciente, consumo de alcohol y tabaco, patología y tratamientos concomitantes así como la dosis total administrada, régimen (administración de cisplatino semanal o trisemanal), cambio de dosis y motivos que lo propiciaron, retrasos en el tratamiento y motivos, dosis total de radioterapia recibida, fecha de inicio y fin del tratamiento para el cálculo de supervivencias, datos

relacionados con la enfermedad: fecha de diagnóstico del tumor primario, localización (nasofaringe, orofaringe, hipofaringe, cavidad oral, faringe), grado de diferenciación tumoral (bien, moderado, bajo) resección quirúrgica, tratamiento adyuvante o radical, estadiaje TNM al diagnóstico o tras cirugía y datos de laboratorio: hematológicos y bioquímicos.

Los hemogramas se realizaron justo antes del inicio del tratamiento combinado y coincidiendo con cada administración de cisplatino.

Se realizó un seguimiento de todos los pacientes con el fin de obtener datos de la duración de la respuesta. Se calculó la supervivencia libre de recidiva local definida como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la recidiva del tumor primario o hasta la fecha fin del seguimiento para determinar el control locorregional de la enfermedad y la supervivencia libre de progresión (SLP) como el tiempo en días desde el diagnóstico hasta la progresión de la enfermedad y supervivencia global (SG) tiempo en días desde el diagnóstico hasta el fallecimiento por cualquier causa.

#### **4.4 Tratamiento y dosificación**

La selección de la terapia se hizo como es habitual según la práctica clínica siguiendo la Guía Asistencial del Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Santiago que recoge las recomendaciones de las Guías Internacionales y en consenso con el Comité de Tumores de ORL del Hospital. Todos los pacientes recibieron radioterapia concomitante con cisplatino con intención radical o adyuvante.

Quimioterapia: La quimioterapia actúa como radiosensibilizante, potenciando los efectos de las radiaciones ionizantes para el control de la enfermedad locorregional a la vez que controla la enfermedad a distancia. Las reducciones de dosis precisas según la toxicidad presente se hicieron en función de la tolerancia del paciente y la experiencia clínica del oncólogo.

La quimioterapia puede administrarse concomitantemente con la radioterapia siguiendo diferentes esquemas.

Cisplatino: esquemas con dosis de 100 mg/m<sup>2</sup> los días 1, 22 y 43 de la RT o dosis de 33 mg/m<sup>2</sup> semanales.

Radioterapia externa: Se realizó mediante un sistema de radioterapia conformacional 3D, previo estudio de TC para la delimitación de los volúmenes de tratamiento.

Volúmenes:

GTV (Gross tumor volume): es la extensión y localización demostrable del crecimiento maligno. Puede definirse un GTV primario (GTV-T), un GTV nodular (GTV-N) y un GTV metastásico (GTV-M). Para definir este volumen nos serviremos de la exploración física y de pruebas de imagen como el TC, RMN o PET-TAC.

CTV (Clinical target volumen): es el volumen de tejido que contiene el GTV demostrable y la enfermedad maligna subclínica que debe ser eliminada. El CTV podrá ser adyacente al GTV (GTV1) o distante al mismo (CTV-2).

PTV (Planning target volume): es un concepto geométrico utilizado en la planificación de un tratamiento, se define para seleccionar tamaños y configuración apropiadas de los haces y así asegurar que la dosis prescrita es realmente administrada al CTV.

Técnica:

Energía: PTV1 y PTV2: Fotones de 6 y 15 MV

Haces: PTV2: 0° (6MV), 80°(6MV), 280°(6MV), 2 campos 135°(6 y 15MV), 2 campos a 220°(6 y 15MV), 120°(6MV), 240° (6MV) y 180°(6MV). PTV1: 280°(6MV), 180°(15MV) y 95°(6MV).

La posición del paciente es en decúbito supino y se inmoviliza con una máscara termoplástica.

La dosis/fracción: 200 cGy y la dosis total: PTV1 y PTV2 dependía de cada paciente.

Con radioterapia externa las dosis máximas toleradas con relación a los órganos críticos oscilan entre los 50 y los 76 Gy con fraccionamiento convencional de 1.8 a 2 Gy/sesión, cinco veces por semana. Dependiendo de factores como tamaño, histología, asociación a quimioterapia, se utilizan distintos niveles de dosis.

A continuación se puede observar en la figura 18 la planificación dosimétrica realizada en el Servicio de Oncología radioterápica en un paciente con un tumor de laringe.

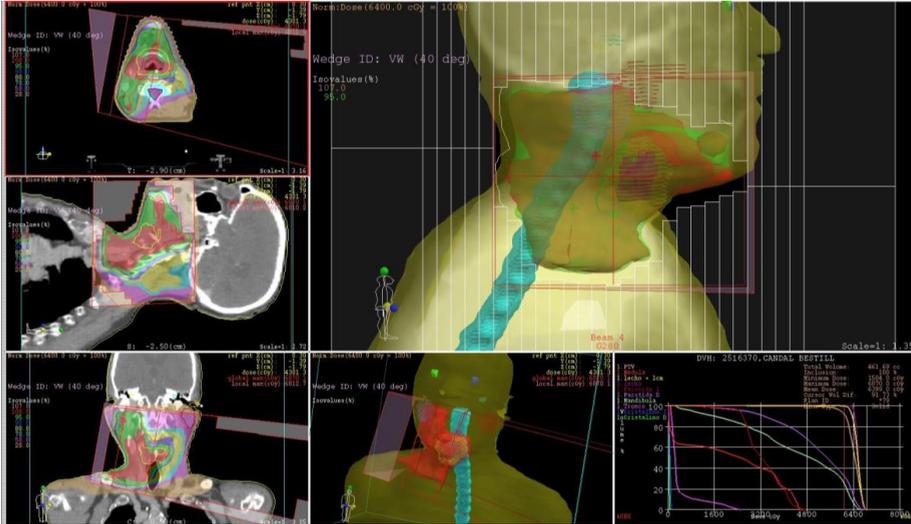


Fig 18: Delimitación de volúmenes de tratamiento con la técnica 3D

#### 4.5 Extracción del ADN

A cada paciente se le extrajo 10 ml de sangre periférica por venopunción con E.D.T.A como anticoagulante para prevenir la coagulación de la sangre, el cual fue enviado a la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica (FPGMX) y almacenado a 4°C o congelado hasta el momento de su procesamiento. La extracción del ADN de cada una de las muestras recibidas se realizó mediante *Chemagic ADN Blood 100 Kit* (Chemagen AG, Baesweiler, Germany), utilizando el robot *Chemagic Magnetic Separation Module I* (Chemagen AG).

Materiales utilizados:

- Tubos estériles de centrifuga de 50ml
- Baño de agua, 37°C
- Isopropanol, a temperatura ambiente
- Etanol 70%, a temperatura ambiente
- Baño, 65°C (opcional; para rápida rehidratación del ADN)

Metodología:

1. Para 10ml de sangre periférica: Añadir 30ml de Solución de Lisis Celular a los tubos estériles de centrifuga de 50ml.

2. Agitar suavemente el tubo de sangre para conseguir una mezcla; posteriormente transferir 10ml de sangre al tubo que contiene la Solución de Lisis Celular. Invertir el tubo 5-6 veces para mezclar.

3. Incubar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente (invertir 2-3 veces durante la incubación) para lisar los glóbulos rojos. Centrifugar a 2000 r.p.m durante 10 minutos a temperatura ambiente.

4. Retirar y desechar el máximo sobrenadante posible sin alterar el pellet blanco visible. Aproximadamente, permanecerá 1.4ml de líquido residual. Si la muestra de sangre ha sido congelada, añadir adicionalmente 30ml de Solución de Lisis Celular, invertir 5-6 veces para mezclar, y repetir los pasos 3-4 hasta que el pellet esté casi blanco. Puede haber algo de pérdida de ADN en muestras congeladas.

Nota: Algunos glóbulos rojos o restos de células pueden ser visibles junto a glóbulos blancos. Si el pellet sólo contiene glóbulos rojos, añadir adicionalmente una alícuota de Solución de Lisis Celular después de eliminar el sobrenadante situado sobre el pellet, y después repetir los pasos 3 y 4.

5. Agitar el tubo vigorosamente hasta que los glóbulos blancos estén resuspendidos (10-15 segundos). Resuspender completamente los glóbulos blancos para obtener una eficiente lisis celular.

6. Añadir 10 ml de Solución de Lisis Nuclear en el tubo que contiene las células resuspendidas. Pipetear la solución 5-6 veces para lisar los glóbulos blancos. La solución podría volverse muy viscosa. Si grupos de células se hacen visibles después de mezclar, incubar la solución a 37°C hasta que los grupos se hayan roto. Si los grupos siguen presentes después de 1 hora, añadir 3ml adicionales de Solución de Lisis Nuclear y repetir la incubación.

7. Opcional: Añadir RNasa A, a una concentración final de 20uq/ml, para el lisado nuclear y mezclar la muestra por inversión del tubo 2-5 veces. Incubar la mezcla a 37°C durante 15 minutos, y dejar enfriar a temperatura ambiente.

8. Añadir 3.3 ml de Solución de Precipitación de Proteínas para el lisado nuclear, y vortear vigorosamente durante 10-20 segundos. Grupos de pequeñas proteínas pueden hacerse visibles después del agitado mediante Vortex.

Nota: Si se añadió adicionalmente Solución de Lisis Nuclear en el paso 6, añadir 4 ml de Solución de Precipitación de Proteínas (en lugar de 3.3 ml).

9. Centrifugar a 2000 r.p.m durante 10 minutos a temperatura ambiente. Podría hacerse visible un pellet marrón oscuro.

10. Transferir el sobrenadante al tubo de centrifuga de 50 ml que contiene 10 ml de isopropanol a temperatura ambiente.

Nota: Algo de sobrenadante puede permanecer en el tubo original conteniendo pellet proteico. Dejar el líquido residual en el tubo para evitar contaminación de la solución de ADN con el precipitado proteico.

11. Mezclar suavemente la solución por inversión hasta que los hilos blancos filiformes de ADN formen una masa visible.

12. Centrifugar a 2000 r.p.m durante 1 minuto a temperatura ambiente. El ADN se visualizará como un pequeño pellet blanco.

13. Decantar el sobrenadante y añadir 10 ml de etanol 70% a temperatura ambiente al ADN. Invertir suavemente el tubo varias veces para lavar pellet de ADN y los lados del tubo de centrifuga. Centrifugar como en el paso 12.

14. El pellet de ADN es muy delicado en este punto y debe ser cuidadosamente manipulado para evitar la aspiración de éste por la pipeta. Dejar secar el pellet durante 10-15 minutos.

15. Añadir 800 µl de Solución de Rehidratación de ADN al tubo, y rehidratar el ADN por incubación a 65°C durante 1 hora. Mezclar la solución periódicamente tapando el tubo. Alternativamente, rehidratar el ADN por incubación de la solución toda la noche a temperatura ambiente o a 4°C.

16. Almacenar el ADN a 2-8°C.

## 4.6 Cuantificación del ADN

La calidad y cantidad de ADN se determinó mediante el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 y posteriormente se normalizaron las muestras a una concentración de 60ng/ul con un volumen mínimo de 20µl.

## 4.7 Selección de genes y SNPs

Para seleccionar los genes y SNPs se hizo una búsqueda bibliográfica de la literatura en la base de datos MEDLINE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>) hasta enero de 2011 utilizando los siguientes descriptores (MeSH): «Head and neck», «mucositis polymorphism», «neutropenia polymorphism», «radiodermatitis polymorphism», «nausea polymorphism», «vomit polymorphism», «diarrhea polymorphism», «acute kidney failure polymorphism», «platinum», «radiochemotherapy», «outcome», «survival», «efficacy», junto con los operadores booleanos. La búsqueda también se centró en las proteínas transportadoras de cisplatino, ya sea relacionadas con este fármaco o polimorfismos en estas proteínas relacionadas con otras enfermedades, pero que tuvieran que ver con una disfunción de la proteína, por lo que probablemente afectarían también al transporte del fármaco.

Se localizaron 1409 artículos, de los que se seleccionaron estudios prospectivos, retrospectivos, transversales y se excluyeron series de casos.

Después mediante software de predicción se observó el impacto de polimorfismos (SIFT, Polyphen-2, PredictSNP) para ver cuáles de ellos se predecía que fueran dañinos y la frecuencia que tenían en la población.

Polyphen-2 asigna una puntuación de 0 a 1 a la probabilidad de que la variante pueda ser perjudicial y clasifica las variantes como seguramente perjudiciales, posiblemente perjudiciales y benignas. SIFT predice el efecto del cambio de aminoácido en la proteína en función del grado de conservación del residuo de interés.

Para aquellos polimorfismos que estaban previamente validados en las bases de datos, se tuvo en cuenta que el alelo menos común tuviera una frecuencia superior al 1% (Minimum Allele Frequency o MAF  $>0,01$ )

En la siguiente tabla 9 se describen los genes candidatos seleccionados:



Tabla 9: Selección de genes candidatos

Genes	SNP	Polyphen	SIFT		MAF	Nº pac (>estudio)	P-VALOR	Variable significativa
			Ortól	Homól				
<b>XRCC1</b>	Arg399Gln (23885GG) (rs25487)	Bening - 0	T (0.17)	D (0.05)	0.366	292	0.031	Mucositis/ Leucopenia Neutropenia/ Radiodermatitis
<b>Ku70 (XRCC6)</b>	(rs2267437) 5' near gene				0.412	116	0.014	Disfagia
<b>ERCC4</b>	Ser835Ser, (rs1799801)					130	0.003	Toxicidad
<b>RAD51</b>	5'UTR G135C - 3429 CC/CG (rs1801320)				0.067	101	0.031 0.011	Radiosensibilidad / CCC/ Disfagia
<b>TGFb1</b>	(rs1800469) -509 C > T					65	0.005	Toxicidad tardía
<b>ND3</b>	10398A > G rs2853826					32	0.01	Fibrosis tardía
<b>RPA34 (Antisense to ERCC-1 protein)</b>	Lys259Thr (rs735482)	Bening - 0	T (0.59)	T (0.6)	0.133	101	0.00005	Respuesta, CCC
<b>XRCC2</b>	rs6464268 5' flank				0.1	60	0.005	Toxicidad aguda a RDT
<b>MMP-2</b>	Intron 5 (rs12934241)				0.395	663	$8.8 \times 10^{-5}$	Leucopenia Neutropenia
<b>SLC28A1 (CNT1)</b>	Arg510Cys - 1528TT (rs2242047)	Probably damaging - 0.999	D (0.5)	D (0.0)	0.018	38	<0.001 0.001	Leucopenia Neutropenia
<b>COX-2 (PTGS2)</b>	rs689466 (-1195G/A)				0.168	212	0.008 0.010	Leucopenia Neutropenia

Genes	SNP	Polyphen	SIFT		MAF	N° pac (>estudio)	P-VALOR	Variable significativa
			Ortól	Homól				
<b>SOD2</b>	Vall6Ala (rs4880)	Bening - 0	T (0.61)	T (0.78)	0.467	71	0.005	Respuesta
<b>IL3</b>	5' near gene (rs1800925)				0.192	71	0.0008	Respuesta
<b>XPD (ERCC2)</b>	Asp312Ans (rs1799793)	Bening - 0.053	T (0.24)	T (0.49)	0.314	104	0.027	Leucopenia Neutropenia
	Arg156Arg (rs238406)				0.479	209	0.009	Leucopenia Neutropenia
<b>XPG (ERCC5)</b>	Lys751Gln (rs13181)	Bening - 0	T (0.96)	T (0.78)	0.396	101	0.0026 (En combinación)	Leucopenia Neutropenia
	Asp1104His (rs17655)	Probably damaging - 1	D (0.04)	D (0.0)	0.267	101	0.0026 (En combinación)	Toxicidad
<b>XPC</b>	Lys939Gln (rs2228001)	Bening - 0	T (0.05)	T (0.07)	0.407	101	0.0026 (En combinación)	Toxicidad
<b>ATP6V1C1</b>	UTR 3' (rs2248718)				0.192	39	0.192	Sobre-expresado en cáncer oral
<b>ABCC2</b>	-24C>T (rs717620)				0.181	112	p<0.01	Toxicidad Mucositis
<b>ABCG2</b>	Gln141Lys - 421 AA (rs2231142)	Bening - 0.442	T	T (0.06)	0.117	65	0.01	Toxicidad Leucopenia Neutropenia
<b>NQO1</b>	rs1800566 Pro153Se	Possibly damaging 0.770			0.186			

CAPÍTULO IV MATERIAL Y MÉTODOS

Genes	SNP	Polyphen	SIFT		MAF	N° pac (>estudio)	P-VALOR	Variable significativa
			Ortól	Homól				
<b>FGFR4</b>	Gly388Arg (rs351855)	Probably damaging – 0.998			0.283	1012	0.04	Toxicidad Leucopenia Neutropenia
<b>ERCC1</b>	Q504K 8092C>A (rs3212986)		T (0.5)	T (0.57)		94	0.011	Respuesta
<b>ERCC1</b>	Asn118Asn -19007TT (rs11615)				0.358	292	0.01-0.02	Leucopenia Neutropenia
<b>XRCC3</b>	Thr241Met 722CT/TT (rs861539)	Bening – 0			0.429	116	0.033	Disfagia CCC
<b>ATP7B</b>	Intron 3 rs2147363 (possible binding site of a transcription factor)				0.305		Nd	Quimiorresistencia
	Val933Ala rs1801249 Val1029Ala	Bening – 0 – 0.001	T (0.29)	T (0.36)	0.434		0.014	
	Val456Leu rs1801244 Val345Leu	Bening – 0.001- 0.003	T (0.76)	T (0.43)	0.482		0.012	
<b>ABCC1 (MRP1)</b>	Gly671Val (rs45511401)	Probably damaging – 1	D (0.0)	D (0.0)	0.095	1012	0.007 (0.16) <sup>1</sup>	Leucopenia Neutropenia
	Val275 Val (rs246221)	Probably damaging – 1	D (0.0)	D (0.0)	0.301	1012	0.01 (0.19) <sup>1</sup>	

Genes	SNP	Polyphen	SIFT		MAF	N° pac (>estudio)	P-VALOR	Variable significativa
			Ortól	Homól				
<b>ABCBI (MDR1)</b>	Ile1145Ile 3435 T/T (rs1045642)				0.429	47	0.042	Leucopenia Neutropenia
	Ser893Ala - 2677G/G (rs2032582)	Bening - 0	T (0.51)	T (0.66)	0.469	95	0.03	Toxicidad Leucopenia Neutropenia
<b>RRM1</b>	UTR-5' - C37A (rs12806698)				0.292	365	0.046	Nauseas Vómitos
<b>CDA</b>	Lys27Gln - 79A>C (rs2072671)	Bening - 0.002	T (0.3)	T (0.49)	0.332			Leucopenia Neutropenia
<b>GSTP1</b>	Ile105Val (rs1695)	Bening - 0	T (0.48)	T (0.68)	0.407		0,023	Toxicidad
<b>ATP7B</b>	Iso A. Lys832Arg Iso B. Lys670Arg Iso C. Lys721Arg (rs1061472)	Bening - 0.423 Probably damaging - 1 Bening - 0.377	T (0.28)	T (0.06)	.447	190	0.028	Quimiorresistencia

## 4.8 Genotipado

El genotipado de los 36 SNPs seleccionados se realizó en el Centro Nacional de Genotipado (CEGEN) en el nodo de Santiago de Compostela mediante tecnología MassARRAY® iPLEX Gold (Sequenom®, San Diego, EE.UU.) utilizando los protocolos y programas informáticos recomendados por Sequenom®.

### 4.8.1 MassArray iPLEX Gold

#### 4.8.1.1 Principios metodológicos de la discriminación alélica por iPLEX

La tecnología de MassARRAY® iPLEX Gold (Sequenom, San Diego, EE.UU.) deriva de la conocida como ensayo MassEXTEND homogéneo o hME (homogeneous MassEXTEND), en el que el oligonucleótido MassEXTEND se une a un sitio adyacente al polimorfismo de interés y, mediante una reacción de PCR, se produce la elongación del oligonucleótido sobre el SNP. El producto resultante de la extensión del oligonucleótido, entre 1 y 4 bases más largo que el primer original, se analiza por MALDI-TOF (desorción- ionización mediante láser asistida por matriz-tiempo de vuelo, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight) y es empleado para determinar la secuencia de nucleótidos en el sitio polimórfico en un proceso de minisequenciación.

#### 4.8.1.2 Ensayo de discriminación alélica por iPLEX

La reacción de iPLEX Gold es un método universal para la detección de inserciones, deleciones, sustituciones y otros polimorfismos en el ADN amplificado. La tecnología iPLEX Gold de Sequenom está diseñada para el genotipado de un número alto de muestras, en placas de 96 y 384 pocillos, y la transferencia de muestras y reactivos está robotizada. Las reacciones para el procesamiento de las muestras se llevan a cabo en termocicladores duales de 384 pocillos, lo que permite un alto grado de multiplexado.

Sequenom utiliza dos reacciones: una de amplificación de los fragmentos que contienen uno o varios de los polimorfismos de interés y otra de extensión de una sola base a partir de una sonda. Debido a esto los diseños de Sequenom para cada polimorfismo consisten en un

fragmento con la base a genotipar y unos 100 pares de bases a cada lado. Un software especial comprobará los posibles iniciadores de PCR y las posibles sondas necesarias para genotipar el polimorfismo. Tras el análisis de los ensayos propuestos el software descarta aquellos SNPs que no se pueden genotipar debido a las características de las regiones contiguas (bien sea por la presencia de otros SNPs, bien por la naturaleza de la secuencia que puede dificultar e incluso impedir la correcta unión de la sonda).

En el ensayo IPLEX se realizan los siguientes pasos que se describen a continuación (ver Figura 19)

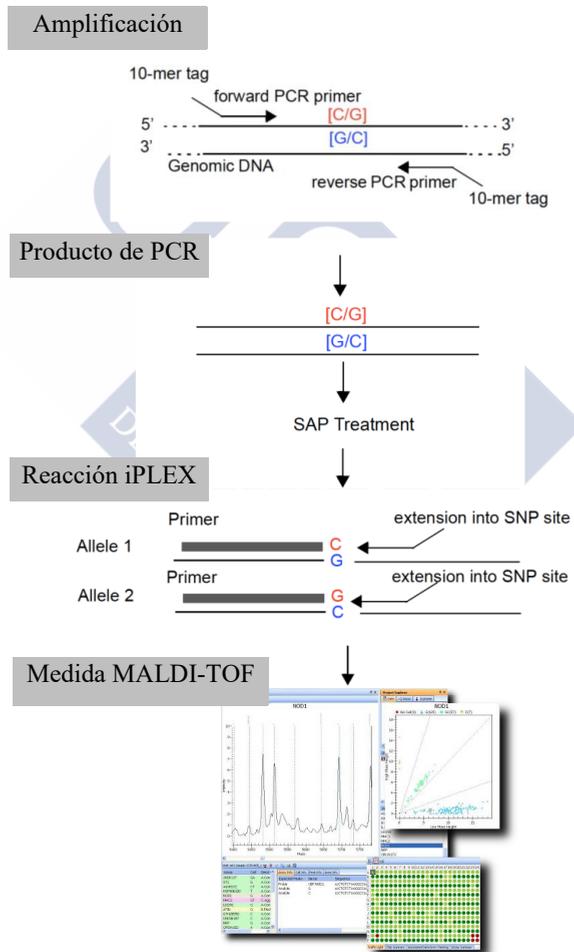


Fig 19: Principios metodológicos de iPLEX

## 1. Amplificación de la región de interés

El protocolo de amplificación por PCR se lleva a cabo según las instrucciones del fabricante: se trabaja con 1x PCR buffer (2mM), MgCl<sub>2</sub> (2mM), dNTPs 500 μM, 100 nM de cada iniciador o primer de PCR y 0.5U de polimerasa HotStar Taq (que contiene un anticuerpo que impide la acción de la enzima a temperatura ambiente, mientras que permite su actuación una vez comienza la PCR y se desnaturaliza). En las reacciones de más de 27 variantes la cantidad de enzima es el doble, es decir 1U. El volumen final de reacción es de 5 μL.

El siguiente paso es la desnaturalización del anticuerpo a 94°C durante 15 minutos, seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 20 segundos, anillamiento a 56°C 30 segundos y elongación a 72°C 1 minuto y por último elongación final a 72°C durante 3 minutos.

Tras la PCR se elimina el exceso de dNTPs que no se han incorporado en la PCR mediante su defosforilación (la defosforilación de cualquier nucleótido residual de la amplificación previene su incorporación en el paso de extensión de oligonucleótidos) a través de un tratamiento enzimático con SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*). El volumen final de la reacción con SAP es de 7μL, que incluyen los 5μL de producto de PCR, 0.3 U de enzima SAP y 10X SAP Buffer. La reacción se incuba en un termociclador a 37°C durante 40 minutos seguido de una segunda incubación de 5 minutos a 85°C.

**Tabla 10: Cocktail PCR multiplex sin ADN**

Reactivos	Concentración en 5μL	Volumen (1rxn)	Volumen (384rxns)
Agua (HPLC)	NA	1,850μL	980,38μL
Buffer PCR(10x) (15mM MgCl <sub>2</sub> )	1,25x	0,625μL	331,3μL
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,625mM	0,325μL	172,3μL
dNTP mix (25mM)	500μM	0,100μL	53,0μL
Primer mix (500nM)	100nM	1,000μL	530,0μL
HoststarTaq (5U/μL)	0,5U/rxn	0,1000μL	53,0μL
<b>Volumen total:</b>		4,000μL	212,0μL

Cuando se trabaja con multiPLEXes, es necesario ajustar las concentraciones de oligos para equilibrar las ratios señal-ruido. Un método general para el ajuste de cebadores consiste en dividir los cebadores en dos grupos dependiendo del tamaño. Todos los cebadores del grupo de mayor tamaño tendrán el doble de concentración (1,25  $\mu\text{M}$  en los 9  $\mu\text{L}$  finales de la reacción) que los del grupo de menor tamaño.

#### Reacción iPLEX

A continuación se lleva a cabo la reacción iPLEX para lograr la extensión de los cebadores. Se procede a preparar la mezcla de reacción de iPLEX Gold con las siguientes cantidades de reactivos para cada pocillo: el volumen de reacción es de 9 $\mu\text{L}$ : 10x del tampón iPLEX Buffer, 1x de la mezcla de extensión iPLEX extensión *mix*, 7  $\mu\text{M}$  y 14  $\mu\text{M}$  de la mezcla de iniciadores (doble concentración en los iniciadores *high mass* con respecto a los *low mass*) y 0.5x de termosecuencia, la enzima con que se lleva a cabo la reacción de extensión.

**Tabla 11: Cocktail reacción iPLEX**

Reactivos	Concentración en 9 $\mu\text{L}$	Volumen (1rxn)	Volumen (384rxns)
Agua (HPLC)	NA	0,7395 $\mu\text{L}$	391,97 $\mu\text{L}$
Tampón plus iPLEX (10x)	0,222X	0,200 $\mu\text{L}$	106,60 $\mu\text{L}$
Terminación <i>mix</i> iPLEX	0,5x	0,100 $\mu\text{L}$	53,00 $\mu\text{L}$
Cebador <i>mix</i> (7 $\mu\text{M}$ :14 $\mu\text{M}$ )	0,625 $\mu\text{M}$ .1,25 $\mu\text{M}$	0,94 $\mu\text{L}$	498,12 $\mu\text{L}$
Enzima iPLEX	0,5x	0,0205 $\mu\text{L}$	10,87 $\mu\text{L}$
<b>Volumen total:</b>		2,000 $\mu\text{L}$	1060,0 $\mu\text{L}$

La tecnología iPLEX Gold presenta dos variantes en función del grado de multiplex; así, del grado de multiplex bajo (*low mass*) permite el genotipado de entre 1-18 variantes por reacción mientras que el de grado alto (*high mass*) permite el genotipado de entre 19 y 36 variantes genéticas por reacción. En los ensayos de más de 18 variantes genéticas además de la enzima también se duplica el volumen de la mezcla de terminación de iPLEX.

Luego se procede a retirar la placa de los productos de amplificación incubados con SAP del termociclador y centrifugarla a 1000 rpm durante 1 minuto. Desechar el film de sellado y añadir el volumen correspondiente de mezcla de reacción iPLEX Gold (2  $\mu$ L) a cada pocillo.

Sellar la placa con film, comprobar que los bordes estén bien pegados e introducirla en un termociclador con el siguiente programa de ciclos:

Desnaturalización inicial a 94°C durante 30 segundos, 40 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 5 segundos, 5 ciclos de 52°C 5 segundos y a 80°C 5 segundos, y extensión final a 72°C durante 3 minutos.

En la reacción de extensión, el iniciador híbrida una base previa al locus en estudio. El genotipado de la muestra se lleva a cabo por la adición de un ddNTP al iniciador de extensión, que será complementario a la base en estudio. Este ddNTP está modificado en masa tal y como se muestra en la tabla 12 a fin de aumentar la diferencia en masa entre las diferentes secuencias extendidas. El cebador de extensión es una base más larga tras la reacción de extensión. Esta base le confiere una masa determinada, que será detectado por el espectrofotómetro MALDITOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) que registra el tiempo de vuelo (*Time Of Flight*) del producto de extensión en el interior de una columna de vacío, tiempo que asocia a una masa que, a su vez, será asociada a un genotipo.

**Tabla 12: Variaciones en masa de los ddNTPs para SBE-Sequenom MassARRAY<sup>®</sup> System.**

Diferencia en masas (Da)						
	Masa original (Da)	Masa modificada (Da)	Adenina	Citosina	Guanina	Timina
Adenina	313.2	360.1	-	24	-16	-55.9
Citosina	289.2	384.1	-24	-	-40	-79.9
Guanina	329.2	344.1	16	40	-	-39.9
Timina	304.2	304.2	55.9	79.9	39.9	-

Tras la reacción de extensión se añade una resina para limpiar las sales del producto de la reacción iPLEX a fin de optimizar el análisis. Después se dispensa la placa de 384 pocillos en un Spectro CHIP bioarray delante el Mass ARRAY Nanodispenser (Sequenom, Inc). Como se señaló, la diferencia en masa tras la reacción de iPLEX es detectada por medio de matrix-assisted láser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF), que

permite llevar a cabo el genotipado automáticamente. El programa de análisis Typeranalyzer v4.0.2 (Sequenom, Inc) identifica los picos de acuerdo a las masas esperadas y asigna un genotipo.

Las variantes analizadas y los iniciadores utilizados en estas reacciones se presentan en el apartado de Anexos.

#### 4.9 Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se evaluaron mediante la t de Student o por la U de Mann Whitney en caso de no seguir una distribución normal. Las variables cualitativas se evalúan mediante el test de ji cuadrado ( $\chi^2$ ) con corrección de continuidad de Yates en los casos de las tablas de 2x2, o bien por la prueba exacta de Fischer en los casos de tablas poco pobladas. Se establece un nivel de significación estadística con un valor de  $p < 0.05$ . Para las comparaciones múltiples con el fin de comprobar si existe interacción entre algunos parámetros clinicopatológicos se utilizó el test ANOVA. La supervivencia se analizó mediante las curvas de Kaplan-Meier utilizando la prueba log-rank.

Con el modelo Cox estimaremos el tiempo de aparición de un suceso (recidiva, muerte) en función de los datos obtenidos para las diferentes variables de interés ya sea en el análisis univariante o multivariante. El paquete estadístico R ha sido el utilizado para el análisis.

##### Control de calidad

Los datos genéticos fueron sometidos a un procedimiento de control de calidad estándar en los estudios de asociación, en función de la desviación del equilibrio Hardy Weinberg y la tasa de genotipado. El equilibrio Hardy Weinberg en la población se valora, para cada SNP, como la diferencia entre la distribución observada de genotipos y su distribución esperada en función de las frecuencias génicas. Dicha diferencia se evalúa estadísticamente mediante un test de chi cuadrado o test exacto. Si bien una población puede no estar en equilibrio por diferentes motivos, aquí se utiliza como una forma de detectar un posible exceso de uno de los genotipos debido a fallos en la técnica de genotipado y, en consecuencia, los SNPs que no están en equilibrio (con una probabilidad  $< 0.001$  en este caso) son eliminados de los análisis posteriores.

Los análisis estadísticos se realizaron en el software R para Windows (librarySNPassoc) y PASW Statistics 18 (IBM SPSS Statistics).

### 1. Análisis estadístico de asociación.

En cada uno de los SNPs las diferencias en frecuencia de genotipos en casos y controles fueron evaluadas mediante regresión logística. El sexo, la edad, el tabaco y alcohol fueron incluidos como covariables en el modelo de regresión logística. Todos los análisis fueron realizados asumiendo diferentes modelos genéticos, ya que el modo de herencia es desconocido. En el modelo dominante los heterocigotos y los homocigotos para el alelo menos frecuente en la población se combinan (se podrían definir como “portadores del alelo raro”) y son comparados con el genotipo homocigoto para el alelo común, que generalmente se usa como categoría de referencia. En el modelo recesivo los homocigotos para el alelo menor se comparan con el grupo combinado de heterocigotos y homocigotos para el alelo común. En el modelo log-aditivo los genotipos son codificados como 0, 1 o 2 en función del número de copias del alelo menos frecuente. El criterio de información de Akaike (AIC) fue usado para seleccionar el mejor modelo genético para cada SNP. En el caso de los SNPs en los que se había menos de 5 observaciones en alguno de los genotipos solo se evaluó el modelo dominante.

Debido al gran número de variables dependientes analizadas y teniendo en cuenta que en cada caso se analizaron los 36 SNPs genotipados, ningún test pasó el umbral de corrección múltiple de Bonferroni ( $0.05/36$ \*(5 toxicidades+ 3 variables respuesta). Las probabilidades mostradas en resultados son las que bajan del umbral de significación nominal ( $p < 0,05$ ) y deben tomarse como indicadoras y no estrictamente significativas.

Adicionalmente para explorar la existencia de interacciones significativas se realizó un análisis de regresión logística incluyendo cada uno de los posibles pares de SNPs y un término de interacción (el producto de ambos). Por último, mediante la herramienta Haploview y la librería haplo.stats de la herramienta R se ha realizado un análisis por haplotipos en algunos genes o regiones cromosómicas en los que se concentraban varios de los SNPs genotipados.

## 2. Análisis multifactorial MDR

El efecto combinado entre SNPs se realizó mediante MDR (multifactor dimensionality reduction, [www.epistasis.org](http://www.epistasis.org)), que es un enfoque no paramétrico de datos que evalúa diferentes combinaciones de factores genéticos o ambientales (SNPs en nuestro caso).

Los datos se dividen en un conjunto de entrenamiento (“training set” (9/10)) y un “testing set” (1/10) para realizar una validación cruzada. Se selecciona un conjunto de  $n$  SNPs (donde  $n$  por lo general comprende 1, 2 y 3 SNPs) y cada combinación genotípica multilocus definida por los  $n$  SNPs se clasifica como de “alto riesgo” o “bajo riesgo” en función del ratio de casos y controles. En cada caso se selecciona el modelo (combinación de SNPs) con menor error de clasificación y se estima el error de predicción en el testing set. El proceso se repite 10 veces, usando un testing set diferente en cada ronda.

Hemos aplicado este software ) para determinar el mejor modelo de 1, 2 y 3 de SNPs para nuestro conjunto de datos, produciendo tres modelos diferentes. De los tres mejores modelos, el que obtuvo la puntuación más alta y la mayor consistencia de validación cruzada (número de veces que un modelo es seleccionado como mejor modelo entre los conjuntos de validación en un procedimiento de diez veces validación cruzada) fue seleccionado como el mejor modelo definitivo.







## **CAPÍTULO V**

### **RESULTADOS**



## 5.1 Características de los sujetos de estudio

Inicialmente se incluyeron en el estudio 115 pacientes pero 5 fueron excluidos por las siguientes causas: insuficiencia renal aguda que requirió cambio de tratamiento, cambio de la intención de tratamiento (paliativo), retiro voluntario del paciente (sólo quiere recibir RDT).

Se estudiaron los antecedentes neoplásicos de los pacientes, y sólo un paciente había padecido un cáncer anteriormente.

El 89,1% de nuestros pacientes eran varones, con una edad media al diagnóstico de 58,59 años (rango de 35 a 80 años; desviación estándar de 8,36). En cuanto a la edad avanzada un 22,7% de los pacientes eran mayores de 65 años.

En relación al hábito tabáquico de los pacientes, el 57,3% eran fumadores. En relación al consumo de alcohol, el 64,5% pacientes eran bebedores mientras que el 35,5% no eran consumidores habituales de alcohol.

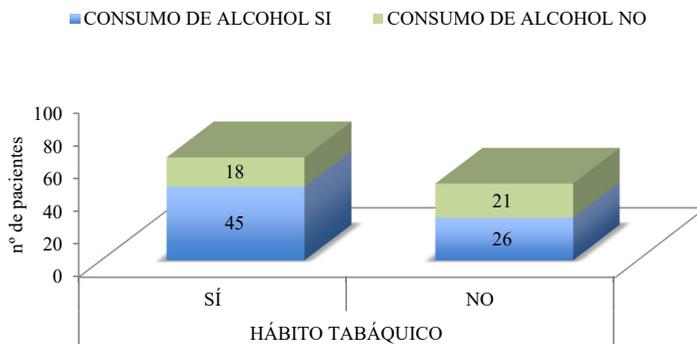


Gráfico 2: Relación de pacientes con el consumo de tabaco y alcohol

En cuanto al estado general del paciente, al inicio del primer ciclo de tratamiento presentaban un PS 0 un 10%, un PS1 un 88,2% y un PS 2 un 1,8% de los pacientes.

## 5.2 Factores relacionados con el tumor

Las lesiones neoplásicas se dividieron según su localización anatómica en 7 grupos. La localización más frecuente fue la hipofaringe con un total de 27 casos, seguido de la laringe y la cavidad oral con 26 y 25 casos respectivamente.

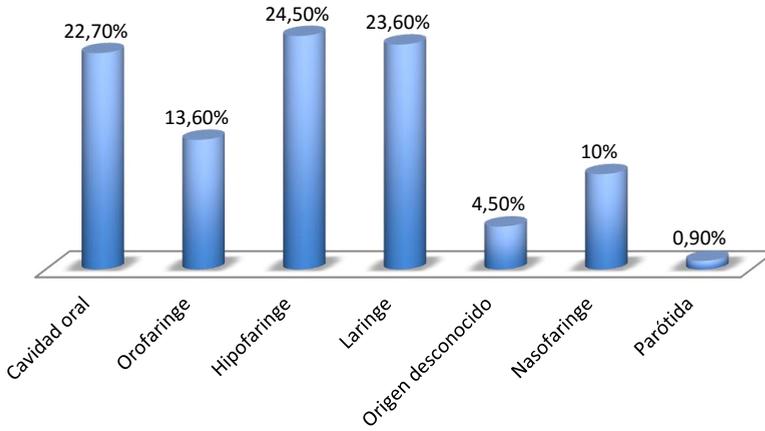


Gráfico 3: Distribución de la localización de las lesiones

Se han clasificado los tumores en función del estadio tumoral en el momento del diagnóstico, siguiendo las directrices del Manual de Estadaje del Cáncer de la AJCC.

Según el tamaño del tumor primario, 16 (14,5%) tumores eran T1, 21 (19,1%) T2, 27 (24,5%) T3 y 35 (31,8%) T4. En el caso de 9 pacientes el tumor no se puede evaluar (Tx) y en 2 pacientes no hay evidencia de tumor primario (T0).

Respecto a los ganglios linfáticos cervicales, la mayoría de los casos presentaban adenopatías cervicales palpables.

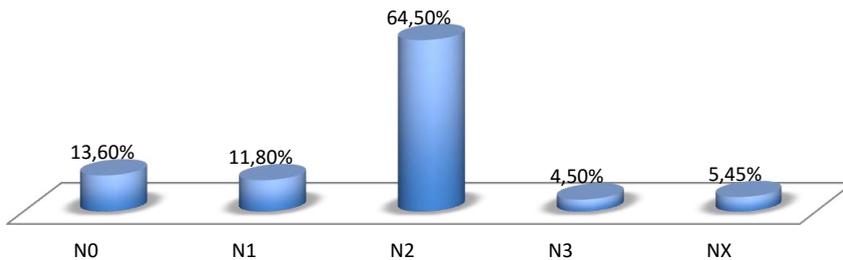


Gráfico 4: Distribución de los pacientes según la afectación de los ganglios

Quince pacientes (13,6%) presentaron tumores en estadio III y 91 (82,7%) en estadio IV. Todos los pacientes tenían una histopatología de carcinoma escamoso, el grado de diferenciación más frecuente fue el moderado en 58 pacientes, seguido del pobre (24 pacientes) y el bien diferenciado (19 pacientes).

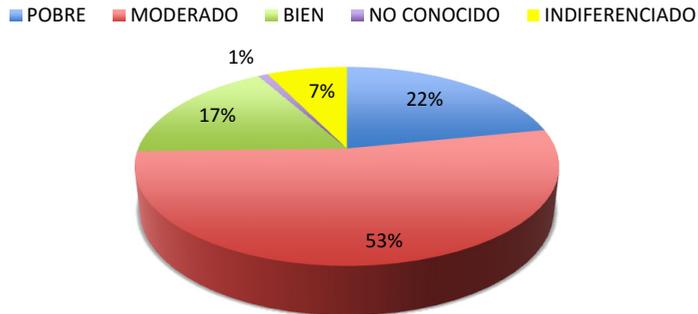


Gráfico 5: Grado de diferenciación

### 5.3 Tratamiento

Un total de 56 pacientes (50,9%) recibieron radioquimioterapia con intención radical mientras que 54 pacientes (49,1%) lo hicieron de forma adyuvante.

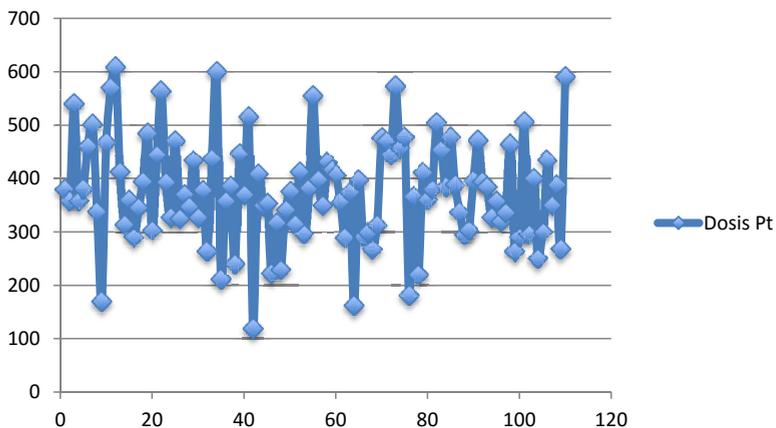


Gráfico 6: Dosis de Platino

En cuanto a las dosis de cisplatino recibidas, la dosis media fue de 376,62 mg. Las principales causas de recibir menos dosis de platino fueron toxicidades graves que requirieron ingreso hospitalario, ingresos por neumonía, fractura patológica de la mandíbula y retrasos por dolor. Sólo dos pacientes (3,7%) requirieron reducción de dosis durante el tratamiento y 4 pacientes necesitaron un retraso en el tratamiento tras el primer ciclo y 9 (16,7%) lo requirieron a lo largo de la RQT debido a las toxicidades graves que presentaron.

Las dosis de radioterapia recibidas han sido las planificadas, sólo a un paciente se le suspendió el tratamiento por presentar una fractura patológica.

Un paciente fue derivado a otro hospital para recibir IMRT debido a que esta técnica no está disponible en el centro y era necesaria para preservar el órgano de la visión.

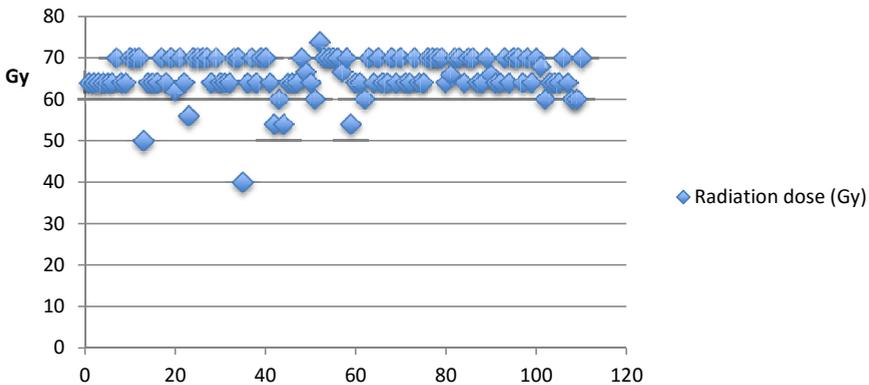


Gráfico 7: Dosis de radioterapia (Gy)

### 5.3.1 Tratamiento radical

#### 5.3.1.1 Respuestas

Un 46,4% de los pacientes presentaron respuesta completa tras el tratamiento radical con QRDT y un paciente progresó durante el tratamiento. El índice/tasa de respuesta global fue del 83,9%.

**Tabla 13: Respuestas según criterios RECIST**

Respuestas	Frecuencia		Porcentaje
EE	7		12,5
RP	21		37,5
RC	26		46,4
PE	2		3,6
Total	56		100,0

### 5.3.1.2 Toxicidades

En cuanto a la aparición de toxicidades tras el primer ciclo de tratamiento se pudo observar que un 7,4% de los pacientes presentaron anemia G1, un 5,6% leucopenia G2, un 3,7% neutropenia G2, un 5,6% diarrea G1 y un 1,9% G3, un 22,2% mucositis G1, 14,8% G2 y sólo un 1,9% G3. Catorce pacientes (25,9%) presentaron disfagia tras el primer ciclo de tratamiento.

**Tabla 14: Peor grado de toxicidad en cualquier ciclo de tratamiento**

Toxicidad	Grado 1		Grado 2		Grado 3	
	N0.	%	N0.	%	N0.	%
<b>Anemia</b>	21	38.9	4	7.4	3	5.6
<b>Leucopenia</b>	8	14.8	20	37.0	3	3.7
<b>Neutropenia</b>	8	14.8	11	20.4	2	3.7
<b>Trombopenia</b>	9	16.7	0	0.0	0	0.0
<b>Nauseas/vomitos</b>	5	9.3	7	13.0	1	1.9
<b>Mucositis</b>	8	14.8	23	42.6	17	31.5
<b>Radiodermitis</b>	10	18.5	30	55.6	7	13.0

Un 69,6% de los pacientes presentaron disfagia a lo largo del tratamiento, ver Tabla 15. Veinte pacientes presentaron odinodisfagia (35,7%) y 9 xerostomía (16,1%).

**Tabla 15: Presencia de disfagia a lo largo del tratamiento radical**

		Frecuencia	Porcentaje
<b>Disfagia</b>	No	17	30,4
	Sí	39	69,6
	Total	56	100,0

### 5.3.1.3 Recidivas y metástasis a distancia

Un 41,1% de los pacientes presentaron recidivas locales, La media del intervalo de presentación fue de 11,98 meses  $\pm$  6,96 (rango 2,4- 31,9 meses).

**Tabla 16: Frecuencia de recidivas tras tratamiento radical**

		Frecuencia	Porcentaje
Recidiva	Sí	23	41,1
	No	33	58,9
	Total	56	100,0

En cuanto a las metástasis a distancia y la aparición de segundos tumores, tres pacientes (5,5%) presentaron metástasis a distancia, se localizaron a nivel pulmonar y pleural. Tres pacientes (5,5%) desarrollaron un segundo tumor primario durante el periodo de seguimiento, se localizaron a nivel pulmonar, renal y esófago. La media del intervalo de presentación de las metástasis a distancia y segundos tumores primarios fue de 10,8 meses  $\pm$  5,44 (rango 2,4- 14,6 meses)

Al final del estudio, 25 (44,6%) pacientes fallecieron, dos pacientes por hemorragia masiva, dos por infección y uno por probable infarto agudo de miocardio, el resto murieron por causas de la enfermedad.

### 5.3.2 Tratamiento adyuvante

La radioterapia postoperatoria se administró a 56 pacientes (50,9%), cinco pacientes presentaron toxicidades graves que le impidieron terminar el tratamiento.

## 5.3.2.1 Toxicidades

En cuanto a la aparición de toxicidades tras el primer ciclo de tratamiento se pudo observar que un 1,9% de los pacientes presentaron anemia G1, un 7,4% diarrea G1, un 25,9% mucositis G1 y un 9,3% G2. Siete pacientes (13%) presentaron disfagia tras el primer ciclo de tratamiento y ninguno presentó leucopenia, neutropenia o trombopenia.

En la tabla 17 se muestran los grados de toxicidad de cada uno de los parámetros recogidos durante el periodo de tratamiento.

**Tabla 17: Grados de toxicidad en cualquier ciclo de tratamiento**

Toxicidad	Grado 1		Grado 2		Grado 3		Grado 4	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
<b>Anemia</b>	19	35,2	5	9,3	1	1,9	0	0,0
<b>Leucopenia</b>	10	18,5	17	31,5	2	3,7	0	0,0
<b>Neutropenia</b>	9	16,7	10	18,5	0	0,0	0	0,0
<b>Trombopenia</b>	8	14,8	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<b>Nauseas/vomitos</b>	7	13,0	5	9,3	0	0,0	0	0,0
<b>Mucositis</b>	14	25,9	24	44,4	8	14,8	2	3,7
<b>Radiodermatitis</b>	12	22,2	32	59,3	6	11,1	0	0,0

Un 51,9% de los pacientes presentaron disfagia a lo largo del tratamiento, ver Tabla 18. Catorce pacientes presentaron odinodisfagia (25,9%), y 5 xerostomia (9,3%).

**Tabla 18: Presencia de disfagia a lo largo del tratamiento adyuvante**

		Frecuencia	Porcentaje
<b>Disfagia</b>	No	26	48,1
	Sí	28	51,9
	Total	54	100,0

## 5.3.2.2 Recidivas y metástasis a distancia

Un 27,8% de los pacientes presentaron recidivas loco-regionales. La media del intervalo de presentación fue de 28,94 meses  $\pm$  14,98 (rango 3,63- 52 meses).

**Tabla 19: Frecuencia de recidivas tras tratamiento adyuvante**

		Frecuencia	Porcentaje
Recidiva	Sí	15	27,8
	No	39	72,2
	Total	54	100,0

En cuanto a las metástasis a distancia y la aparición de segundos tumores, dos pacientes (3,7%) presentaron metástasis a distancia, se localizaron a múltiples niveles y cerebral que requirió radiocirugía. Dos pacientes (3,7%) desarrollaron un segundo tumor primario durante el periodo de seguimiento, se localizaron a nivel pulmonar.

Al final del estudio, 17 (31,4%) pacientes fallecieron, un paciente por muerte súbita y otro por peritonitis, el resto murieron por causas de la enfermedad.

## 5.4 Genotipado de los polimorfismos

De los polimorfismos seleccionados inicialmente, ninguno se ha eliminado del estudio, se han genotipado todos mediante la plataforma sequenom.

Ningún polimorfismo se excluyó por no superar el control de calidad establecido. Treinta y cinco polimorfismos cumplieron el equilibrio de Hardy-Weinberg excepto para el rs2853826, polimorfismo genético mitocondrial.

**Tabla 20: Distribución de los polimorfismos en nuestra población**

SNP	AA	Aa	aa	Alelo frecuente	Heterocigoto	N	Equilibrio H-W	Tasa de genotipado	MAF
rs1045642	29	64	17	CC	CT	110	0,0624	100	0,4454
rs1061472	44	49	17	GG	AG	110	0,5856	100	0,3772
rs11615	35	57	18	TT	CT	110	0,5174	100	0,4227
rs12806698	59	43	8	CC	AC	110	0,9656	100	0,2681
rs12934241	47	55	8	CC	CT	110	0,1315	100	0,3227

SNP	AA	Aa	aa	Alelo frecuente	Heterocigoto	N	Equilibrio H-W	Tasa de genotipado	MAF
rs13181	37	51	22	TT	GT	110	0,5629	100	0,4318
rs1695	52	48	10	AA	AG	110	0,8201	100	0,3090
rs17655	59	46	5	CC	CG	110	0,2851	100	0,2545
rs1799793	40	46	14	GG	AG	100	0,8942	90,91	0,3700
rs1799801	47	54	9	TT	CT	110	0,2283	100	0,3272
rs1800469	50	46	7	CC	CT	103	0,4068	93,64	0,2912
rs1800566	63	36	11	CC	CT	110	0,0994	100	0,2636
rs1800925	74	32	4	CC	CT	110	0,8157	100	0,1818
rs1801244	36	48	26	CC	CG	110	0,2081	100	0,4545
rs1801320	93	17	0	GG	CG	110	0,3797	100	0,0772
rs2032582 <sup>a</sup>	34	54	13	GG	GT	101	0,2371	91,82	0,3960
rs2072671	47	55	8	AA	AC	110	0,1315	100	0,3227
rs2147363	62	42	6	GG	GT	110	0,7467	100	0,2454
rs2228001	42	49	19	AA	AC	110	0,4733	100	0,3954
rs2231142	95	14	1	CC	AC	110	0,5543	100	0,0727
rs2242047	101	9	0	GG	AG	110	0,6546	100	0,0409
rs2248718	84	24	2	CC	CT	110	0,8514	100	0,1272
rs2267437	44	49	17	CC	CG	110	0,5856	100	0,3772
rs238406	44	46	20	GG	GT	110	0,2013	100	0,3909
rs246221	49	49	12	TT	CT	110	0,9618	100	0,3318
rs25487	42	53	15	GG	AG	110	0,7898	100	0,3772
rs2853826 <sup>b</sup>	87	0	23			110	0	100	0,2090
rs3212986	69	33	8	GG	GT	110	0,1613	100	0,2227
rs351855	60	46	4	CC	CT	110	0,1762	100	0,2454
rs45511401	98	12	0	GG	GT	110	0,5451	100	0,0545
rs4880	36	44	30	TT	CT	110	0,0382	100	0,4727
rs6464268	80	30	0	AA	AG	110	0,0977	100	0,1363
rs689466	80	26	4	AA	AG	110	0,3164	100	0,1545
rs717620	73	29	8	GG	AG	110	0,0464	100	0,2045
rs735482	77	28	5	AA	AC	110	0,2516	100	0,1727
rs861539	38	49	23	CC	CT	110	0,3334	100	0,4318

Nota: <sup>a</sup> SNP trialélico, 7 pacientes (3AG y 4AT) eran portadores de un tercer alelo A

<sup>b</sup> SNP mitocondrial

## 5.5 Asociación de polimorfismos con toxicidades

El análisis de asociación de polimorfismos de genes involucrados con las toxicidades se realizó mediante regresión logística. Se muestran los SNPs asociados con una probabilidad nominal  $<5\%$  en alguno de los modelos genéticos probados, los datos incluyeron ajuste por las covariables edad, sexo, consumo de alcohol y tabaco, se indica la significación, determinada por el valor  $p$ , de todos los resultados obtenidos en el análisis de asociación con la presencia de toxicidades hematológicas y no hematológicas durante el período de tratamiento.

Debido al gran número de variables dependientes exploradas (5 toxicidades graves, que además se analizan agrupadas, y 3 indicadores de respuesta) el número de tests realizados es muy alto (al menos 8 variables por 36 SNPs, un total de 288 tests) por lo que el umbral de Bonferroni sería  $1.7 \cdot 10^{-5}$ . Este umbral no es superado en ningún caso, por lo que las probabilidades encontradas nunca son estrictamente significativas, si bien pueden ser indicadoras de señales interesantes, especialmente cuando hay varias señales apuntando al mismo gen.

Por lo que, mostramos los mejores SNPs de cada grupo basado en el valor de  $p$  más bajo en el test alélico (Regresión logística ajustada por covariables), y que fueron considerados según nuestra clasificación como sugestivos de relevancia estadística cuando presentaron valores de  $p < 5\%$ .

### 5.5.1 Toxicidad hematológica

De los 36 SNPs analizados 6 polimorfismos fueron los más relevantes estadísticamente con la toxicidad hematológica G2-3, agrupada en forma de neutropenia, leucopenia o anemia.

El rs2032582, en el cromosoma 7 del gen ABCB1, se asoció con un mayor riesgo de toxicidad hematológica bajo el modelo de herencia aditivo, el 53,85% de los pacientes con el genotipo T/T presentaron toxicidad hematológica mientras que los del genotipo G/T el 33,4% y los G/G sólo el 18,75% (OR=1,95; IC95% (1,00-3,82);  $p=0,0497$ ).

Para el rs246221 (ABCC1), los pacientes con el genotipo TT o CT muestran menor toxicidad que los que tienen el genotipo CC (28,5% vs 58,3%; OR=3,90; IC95% (1,11-13,68);  $p=0,0333$ ). El alelo T del rs2147363 (ATP7B), se asoció como factor protector de toxicidad hematológica en el modelo aditivo (TT, OR=0,46; IC95% (0,21-0,98);  $p=0,0454$ ).

Otros tres polimorfismos implicados en la reparación del ADN, rs11615, rs1799801 y rs735482, se asociaron como factor protector de toxicidad hematológica bajo el modelo dominante, como se muestra en la Tabla 21:

El modelo recesivo no se muestra en los casos en los que el recuento de homocigotos para el alelo menos frecuente sea menor de 5.

**Tabla 21: SNPs que mostraron asociación significativa con toxicidad hematológica**

GEN	SNP	MODELO	Controles/Casos	OR	(IC 95%) <sup>a</sup>	Valor p
ABCB1 (MDR1)	rs2032582	Dominante		2,28	(0,85-6,11)	0,1019
		GG	26/6			
		GT+TT	42/25			
		<b>Aditivo</b> GG, GT, TT	26,36,6/6,18,7	<b>1,95</b>	<b>(1,00-3,82)</b>	<b>0,0497</b>
		Recesivo		2,61	(0,79-8,67)	0,1164
		GG+GT	62/24			
		TT	6/7			
ABCC1 (MRP1)	rs246221	Dominante		1,34	(0,58-3,08)	0,4899
		TT	35/14			
		CT+CC	40/21			
		<b>Aditivo</b> TT,CT,CC	35,35,5/14,14,7	1,63	(0,88-3,03)	0,1208
		<b>Recesivo</b> TT+CT	70/28	<b>3,90</b>	<b>(1,11-13,68)</b>	<b>0,0333</b>
		CC	5/7			
ATP7B	rs2147363	Dominante		0,49	(0,21-1,14)	0,0972
		GG	38/24			
		GT+TT	37/11			
		<b>Aditivo</b> GG,GT,TT	38,31,6/24,11,0	<b>0,46</b>	<b>(0,21-0,98)</b>	<b>0,0454</b>
ERCC1	rs11615	<b>Dominante</b>		<b>0,29</b>	<b>(0,12-0,71)</b>	<b>0,0066</b>
		TT	18/17			
		CT+CC	57/18			
		<b>Aditivo</b> TT,CT,CC	18,42,15/17,15,3	<b>0,41</b>	<b>(0,20-0,80)</b>	<b>0,0094</b>
ERCC4	rs1799801	<b>Dominante</b>		<b>0,39</b>	<b>(0,17-0,91)</b>	<b>0,0286</b>
		TT	27/20			
		CT+CC	48/15			
		<b>Aditivo</b> TT,CT,CC	27,42,6/20,12,3	0,55	(0,27-1,10)	0,0883
RPA3A	rs735482	<b>Dominante</b>		<b>0,28</b>	<b>(0,10-0,82)</b>	<b>0,0204</b>
		AA	47/30			
		AC+CC	28/5			
		<b>Aditivo</b> AA, AC,CC	47,24,4/30,4,1	0,38	(0,15-0,94)	0,0369

a. Análisis de regresión logística ajustado por edad, sexo, consumo de tabaco y alcohol.

### 5.5.2 Toxicidad no hematológica

Se analizó la asociación de un total de 36 polimorfismos en los genes candidatos seleccionados y sólo se encontró para el SNP rs45511401 del gen transportador ABCC1 una asociación estadísticamente relevante con toxicidad no hematológica: pacientes con el genotipo GG desarrollan más toxicidad no hematológica que los que tienen el genotipo GT o TT (69,4% vs 33,3%; OR=4,07; IC95% (1,01-16,45); p= 0,048 en el modelo dominante).

**Tabla 22: SNPs que mostraron asociación significativa con toxicidad no hematológica**

GEN	SNP	MODELO	Controles/Casos	OR	IC 95%	Valor p
ABCC1 (MRP1)	rs45511401	Dominante GG GT+TT	30/68 8/4	<b>4,07</b>	<b>(1,01-16,45)</b>	<b>0,0489</b>

Nota: Menos de 5 observaciones sólo se muestra el modelo dominante

### 5.5.3 Toxicidades graves

Se ha realizado un análisis de cada una de las toxicidades graves presentes en nuestra cohorte de pacientes.

En el caso de la mucositis G3-4 se ha encontrado una significación en dos genes transportadores, en el caso del ABCB1 con rs1045642 para el modelo recesivo y para ABCC1, rs45511401 para el modelo dominante y aditivo.

En cuanto a la presencia de disfagia, se encontraron dos SNPs en el gen ATP7B, el rs1061472 en el que el alelo A se asoció como factor protector de disfagia y el rs1801244 en el que el alelo G se asoció como factor protector de disfagia bajo el modelo de herencia dominante.

En el caso de los genes reparadores del ADN, se encontró una asociación para los genes ERCC1 y RPA3A bajo el modelo aditivo y recesivo.

El dato más interesante ha sido el polimorfismo rs1695 del gen GSTP1, el alelo G se asoció significativamente como factor protector de disfagia tanto en el modelo dominante (OR=0,20, IC95%: 0,08-0,50, p=0,0004) como en el aditivo. Cuando se realiza bonferroni se pierde la significación.

En el caso de la neutropenia grado 2-3, se ha encontrado una significación en los transportadores ABCB1, ABCC1 y ATP7B y en el caso del RAD51 bajo el modelo dominante. Para el rs2032582 sólo el 13,3% de los pacientes con el genotipo GG desarrollan

neutropenia G2-3, mientras que el 26,5% de los casos para el genotipo GT y el 45,4% para los TT (OR=2,36; IC95%: 1,06-5,26,  $p=0,0352$  en el modelo aditivo). Para el rs246221, el 20,4% de los pacientes con el alelo T (TT y CT) desarrollan neutropenia comparado con el 50% de los pacientes con el genotipo CC (OR=4,07; IC95%:(1,03-16,01),  $p=0,0446$  en el modelo recesivo). El rs2147363 se asoció a una menor probabilidad de desarrollar neutropenia bajo el modelo aditivo (OR=0,36; IC95%:(0,14-0,95),  $p=0,0385$ ) y el rs1801320, los pacientes con el genotipo GG muestran menos neutropenia G2-3 que los del genotipo CG o CC (19% vs 46,6%; OR=3,72; IC95%: (1,17-11,86),  $p=0,0265$ ) en el modelo dominante.

Para la presencia de leucopenia G3, se encontró una asociación significativa con genes reparadores de ADN, los polimorfismos rs1801320 y rs6464268 tienen más riesgo de leucopenia grave en el modelo dominante, y en el caso del gen ERCC1, con rs11615, un efecto protector bajo el modelo dominante y aditivo.

Por último para la presencia de anemia G2-3 sólo se encontró una asociación con dos SNPs, rs238406 y rs13181, del gen ERCC2 bajo el modelo dominante y aditivo respectivamente. Tanto para la leucopenia como para la anemia los casos son muy pocos, por tanto, los resultados habrá que valorarlos con mucha cautela porque pueden ser espurios.



**Tabla 23: Análisis de las variantes genéticas y su asociación con toxicidades graves**

GEN	SNP	MODELO	Casos/Controles	OR	IC 95%	Valor p
<b>Mucositis</b>						
ABCB1 (MDR1)	rs1045642	Dominante CC CT+TT	6/21 22/51	2,01	(0,63-6,47)	0,2412
		Aditivo CC,CT,TT	6,14,8/21,42,9	2,15	(1,00-4,63)	0,0506
		Recesivo CC+CT TT	20/63 8/9	<b>3,42</b>	<b>(1,04-11,21)</b>	<b>0,0427</b>
ABCC1 (MRP1)	rs45511401	Dominante GG GT+TT	21/68 7/4	<b>4,68</b>	<b>(1,08-20,24)</b>	<b>0,0389</b>
<b>Disfagia</b>						
ATP7B	rs1061472	Dominante GG AG+AA	32/12 35/31	<b>0,36</b>	<b>(0,15-0,85)</b>	<b>0,0203</b>
		Aditivo GG,AG,AA	32,26,9/12,23,8	0,60	(0,34-1,05)	0,0748
		Recesivo GG+AG AA	58/31 9/8	0,82	(0,28-2,41)	0,7181
	rs1801244	Dominante CC CG+GG	26/10 41/33	<b>0,39</b>	<b>(0,16-0,99)</b>	<b>0,0469</b>
		Aditivo CC,CG,GG	26,28,13/10,20,13	<b>0,57</b>	<b>(0,33-1,00)</b>	<b>0,0489</b>
		Recesivo CC+CG GG	54/30 13/13	0,54	(0,21-1,37)	0,1910
ERCC1	rs3212986	Dominante GG GT+TT	45/24 22/19	0,53	(0,23-1,21)	0,1328
		Aditivo GG,GT,TT	45,20,2/24,13,6	<b>0,49</b>	<b>(0,25-0,94)</b>	<b>0,0324</b>
<b>GSTP1</b>	<b>rs1695</b>	<b>Dominante</b> AA AG+GG	40/12 27/31	<b>0,20</b>	<b>(0,08-0,50)</b>	<b>0,0004</b>
		Aditivo AA, AG,GG	40,21,6/12,27,4	<b>0,38</b>	<b>(0,19-0,75)</b>	<b>0,0050</b>
RPA34	rs735482	Dominante AA AC+CC	43/34 24/9	2,24	(0,89-5,65)	0,0880
		Aditivo AA, AC,CC	43,19,5/34,9,0	<b>2,37</b>	<b>(1,04-5,43)</b>	<b>0,0411</b>

GEN	SNP	MODELO	Casos/Controles	OR	IC 95%	Valor p
<b>Neutropenia</b>						
ABCB1	rs2032582	Dominante GG GT+TT Aditivo GG, GT, TT Recesivo GG+GT TT	4/26 18/42 4,13,5/26,36,6	3,04 <b>2,36</b> 2,99	(0,87-10,61) <b>(1,06-5,26)</b> (0,81-11,12)	0,0814 <b>0,0352</b> 0,1014
ABCC1	rs246221	Dominante TT CT+CC Aditivo TT,CT,CC Recesivo TT+CT CC	11/35 12/40 11,7,5/35,35,5 18/70 5/5	0,97 1,40 <b>4,07</b>	(0,37-2,53) (0,69-2,84) <b>(1,03-16,01)</b>	0,9541 0,3528 <b>0,0446</b>
ATP7B	rs2147363	Dominante GG GT+TT Aditivo GG,GT,TT	17/38 6/37 17,6,0/38,31,6	0,36 <b>0,36</b>	(0,13-1,03) <b>(0,14-0,95)</b>	0,0572 <b>0,0385</b>
RAD51	rs1801320	Dominante GG CG+CC	16/67 7/8	<b>3,72</b>	<b>(1,17-11,86)</b>	<b>0,0265</b>
<b>Leucopenia</b>						
ERCC1	rs11615	Dominante TT CT+CC Aditivo TT, CT, CC	5/18 4/57 5,4,0/18,42,15	<b>0,17</b> <b>0,19</b>	<b>(0,03-0,89)</b> <b>(0,04-0,84)</b>	<b>0,0361</b> <b>0,0289</b>
RAD51	rs1801320	Dominante GG GC+CC	5/67 4/8	<b>8,51</b>	<b>(1,69-42,90)</b>	<b>0,0095</b>
XRCC2	rs6464268	Dominante AA AG+GG	4/56 5/19	<b>5,19</b>	<b>(1,09-24,60)</b>	<b>0,0380</b>
<b>Anemia</b>						
ERCC2	rs13181	Dominante TT TG+GG Aditivo TT, TG, GG	1/28 12/47 1,7,5/28,31,16	7,35 <b>2,61</b>	(0,87-61,89) <b>(1,03-6,66)</b>	0,0665 <b>0,0442</b>

GEN	SNP	MODELO	Casos/Controles	OR	IC 95%	Valor p
		Recesivo TT+TG GG	8/59 5/16	2,60	(0,66-10,29)	0,1742
	rs238406	Dominante GG GT+TT	9/29 4/46	<b>0,23</b>	<b>(0,06-0,89)</b>	<b>0,0329</b>
		Aditivo GG, GT, TT	9,3,1/29,32,14	0,35	(0,12-1,01)	0,0513

Nota: Menos de 5 observaciones sólo se muestra el modelo dominante

## 5.6 Genes involucrados en la respuesta

La tabla 24 muestra el análisis de asociación de las variantes genéticas con la tasa de respuestas de los pacientes con estadio III y IV tratados con intención radical.

Para el rs1045642 localizado en el gen ABCB1 se encontró una correlación con la respuesta, los pacientes con el genotipo CT o TT muestran una peor tasa de respuestas que los pacientes con la variante genotípica CC (61,9% vs 25,0%; OR=7,18; IC95% (1,41-36,45), p=0,0320) en el modelo dominante. Tres SNPs, localizados en ERCC2 muestran una asociación, para el rs1799793, el 70,6% de los pacientes con el genotipo GG han tenido respuesta completa mientras que el 43,5% con el genotipo AG y el 22,2% con el genotipo AA (OR=2,84; IC95% (1,08-7,45), p=0,0194 en el modelo aditivo). Para el rs13181, pacientes que tienen al menos una alelo G dominante (GG o GT) muestran una menor tasa de respuestas completas que los que presentan el genotipo TT (35,0% vs 68,8%; OR=3,36; IC95% (0,90-12,55), p=0,0368 en el modelo dominante). Para el rs238406, los pacientes con el genotipo GG muestran una menor tasa de respuestas completas que los que tienen el genotipo GT o TT (27,3% vs 52,8%; OR=0,022; IC95%(0,06-0,81), p=0,0231 en el modelo dominante).

Se analizó también la asociación agrupando a los respondedores como los que presentaban RC+RP pero se desestimaron los resultados debido a que el número de casos en los análisis era <5.

**Tabla 24: Análisis de las variantes genéticas y su asociación con la tasa de respuestas**

GEN	SNP	MODELO	Controles /Casos	OR	(IC 95%) <sup>a</sup>	Valor p
Respuestas (RC vs resto)						
ABCB1 (MDR1)	rs1045642	Dominante CC CT+TT	9/3 16/26	<b>7,18</b>	<b>(1,41-36,45)</b>	<b>0,0320</b>
		Aditivo CC,CT,TT	9,11,5/3,22,4	1,96	(0,75-5,11)	0,2564
		Recesivo CC+CT TT	20/25 5/4	0,70	(0,16-3,16)	0,5436
ERCC2 (XPD)	rs1799793	Dominante GG AG-AA	12/5 12/20	3,83	(0,95-15,48)	0,0317
		Aditivo GG, AG, AA	12,10,2/5,13,7	<b>2,84</b>	<b>(1,08-7,45)</b>	<b>0,0194</b>
		Recesivo GG-AG AA	22/18 2/7	4,21	(0,74-23,79)	0,0920
	rs238406	Dominante GG GT+TT	6/16 19/17	<b>0,22</b>	<b>(0,06-0,81)</b>	<b>0,0231</b>
		Aditivo GG,GT,TT	6,13,6/16,11,2	<b>0,28</b>	<b>(0,10-0,75)</b>	<b>0,0156</b>
		Recesivo GG+GT TT	19/27 6/2	0,13	(0,02-1,09)	0,0955
	rs13181	Dominante TT GT+GG	11/5 14/24	<b>3,36</b>	<b>(0,90-12,55)</b>	<b>0,0368</b>
		Aditivo TT, GT, GG	11,9,5/5,16,8	1,69	(0,79-3,87)	0,0909
		Recesivo TT+GT GG	20/21 5/8	1,11	(0,28-4,38)	0,5170

Se analizó si existía una significación entre las respuestas y factores relacionados con el tumor, como es el tamaño, ganglios y estadio. Sólo se ha encontrado una correlación significativa con el tamaño, un 29,5% de los pacientes T1-2 presentaron RC frente al 63,88% de los T3-4,  $p=0,037$ .

Por otra parte se ha observado un efecto protector de la variante T del polimorfismo FGFR4 G388A en relación al tamaño tumoral,  $OR=0,19$ ;  $IC95\%$  (0,05-0,73),  $p=0,0084$  en el modelo dominante. El 83,3% de los tumores T3-T4 presentaban el genotipo CC mientras un 16,7% de los T1-T2 tenían este genotipo.

Posteriormente, hemos analizado mediante un modelo de regresión múltiple de tipo stepwise los SNPs y covariables que obtuvieron una probabilidad  $<0.05$  en el análisis anterior para cada uno de los modelos de herencia, para intentar determinar cada uno de los efectos independientes de los múltiples marcadores asociados. En las siguientes tablas sólo se muestra el modelo dominante.

Para el caso de disfagia, el coeficiente de determinación es  $R^2=0,23$  y destaca la probabilidad obtenida con el gen GSTP1 ( $p=0,0006$ )

**Tabla 25: Regresión logística múltiple con selección de variables para disfagia**

Parámetros	Coefficiente de regresión	OR	IC 95%	Probabilidad
rs1695	-1,9362	0,144	(0,048-0,436)	0,0006
rs351855	-1,1117	0,329	(0,121-0,895)	0,0295
rs717620	-1,1383	0,320	(0,105-0,979)	0,0457

Para el caso de la toxicidad hematológica, el coeficiente de determinación es  $R^2=0,32$

**Tabla 26: Regresión logística múltiple con selección de variables para toxicidad hematológica**

Parámetros	Coefficiente de regresión	OR	IC 95%	Probabilidad
rs17655	1,2117	3,359	(1,010-11,175)	0,0482
rs1799801	-1,3926	0,248	(0,080-0,776)	0,0166
rs2032582	1,4697	4,348	(1,151-16,430)	0,0303
rs2147363	-1,8042	0,165	(0,047-0,572)	0,0045
rs2248718	1,9516	7,040	(1,482-33,433)	0,0141
rs735482	-2,1951	0,111	(0,023-0,534)	0,0061
Tabaco	-1,8311	0,160	(0,032-0,811)	0,0269

Para el tamaño tumoral el coeficiente de determinación es  $R^2=0,22$

**Tabla 27: Regresión logística múltiple con selección de variables para el tamaño tumoral**

Parámetros	Coefficiente de regresión	OR	IC 95%	Probabilidad
rs1800566	-1,8573	0,156	(0,028-0,886)	0,0360
rs351855	-2,1454	0,117	(0,021-0,639)	0,0133

## 5.7 Interacciones entre SNPs

Una de las tendencias actuales es la búsqueda de interacciones entre genes, los resultados obtenidos al utilizar la librería SNPassoc de R se muestran en forma de matriz, donde las celdas corresponden a los p-valor obtenidos para cada par de SNPs evaluados y se representan mediante colores, el verde oscuro significa un valor de p por debajo de 0,001.

En el gráfico, la diagonal muestra el p valor para el SNP individual, en la parte inferior se muestra en qué medida el modelo de la combinación de SNPs supera al modelo de los dos individuales y en la parte superior se muestra la significación del término de interacción para ese par de SNPs.

Para el caso de las toxicidades hematológicas no se han encontrados señales muy fuertes



Gráfico 8: Interacciones entre SNP para toxicidad hematológica

Para las toxicidades no hematológicas, las únicas interacciones fuertes que destacan son las ocurridas entre ABCC1 (rs45511401) y MMP2 (rs12934241) y para ND3 (rs2853826) y SOD2 (rs4880).

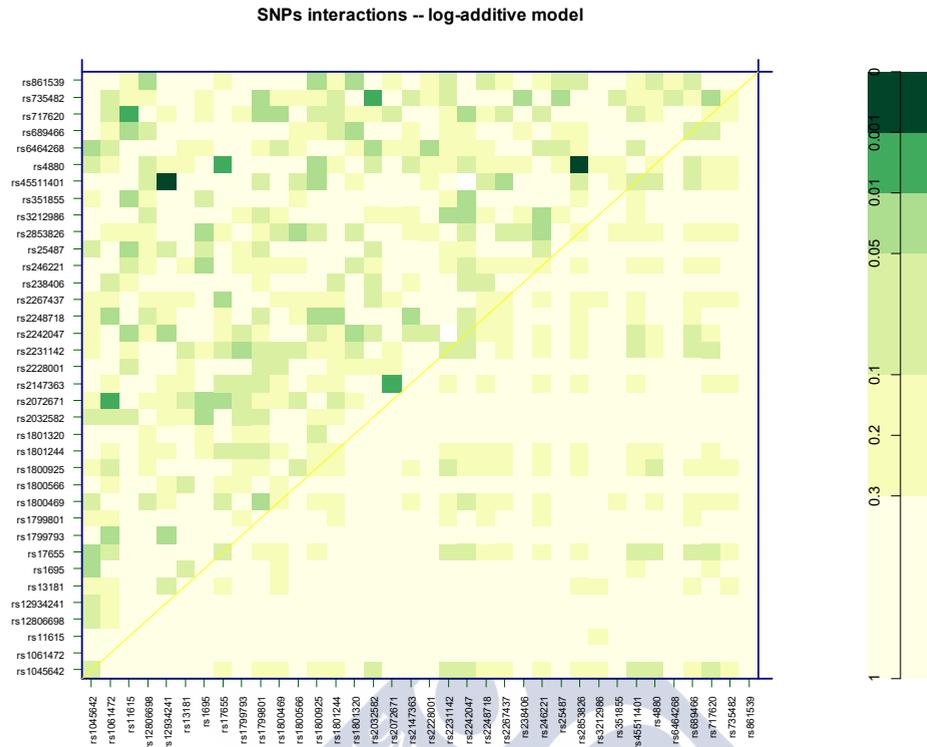


Gráfico 9: Interacciones entre SNP para no toxicidad hematológica

En cuanto a las respuestas, podemos observar interacciones fuertes entre *FGFR4* (rs351855) y *ERCC4* (rs1799801), y entre *ATP7B* (rs2147363) y *ERCC4* (rs1799801) y entre *ABCC1* (rs45511401) y *ERCC1* (rs3212986).

En el caso de la interacción *ABCC1* y *ERCC1*, el ajuste del modelo es cuestionable porque no se puede calcular el máximo de verisimilitud.

SNPs interactions -- dominant model

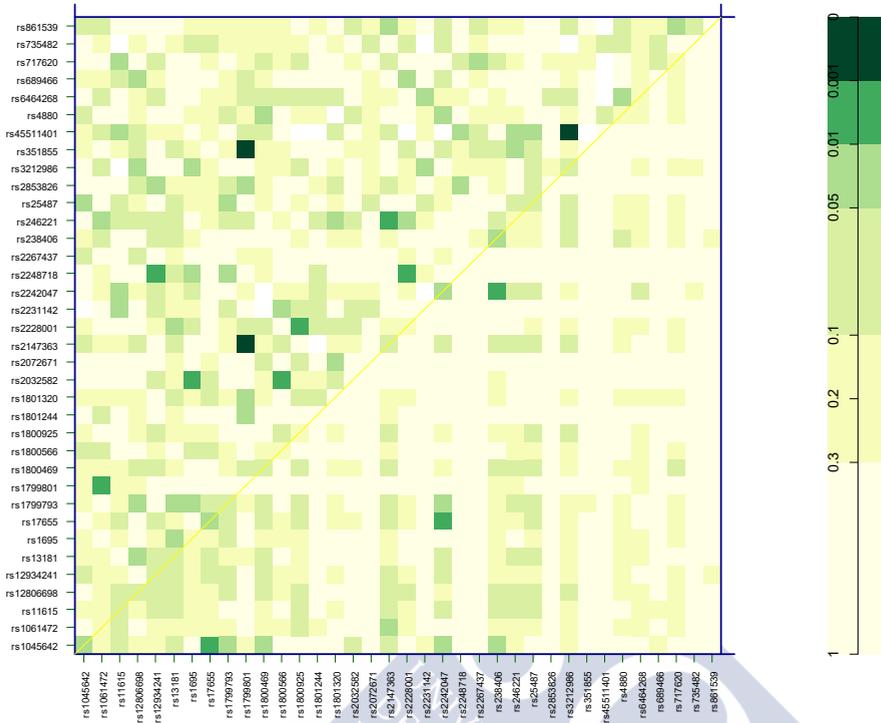


Gráfico 10: Interacciones entre SNPs para la tasa de respuestas

Posteriormente, se analizaron estas interacciones mediante regresión logística múltiple, donde se identificaron resultados muy interesantes.

**Tabla 28: Regresión logística múltiple de las interacciones entre FGFR4 y ERCC4**

Parámetros	Coefficiente de regresión	OR	IC 95%	Probabilidad
rs351855	-3,0766	0,046	(0,004-0,567)	0,0163
rs1799801	-1,6334	0,195	(0,031-1,215)	0,0799
rs351855- rs1799801	5,2936	199,056	(6,357->999,99)	0,0026
Edad	0,0118	1,012	(0,924-1,108)	0,8007
Sexo	1,8650	6,456	(0,572-72,855)	0,1315
Alcohol	-0,7976	0,450	(0,103-1,967)	0,2889
Tabaco	-1,8311	0,160	(0,032-0,811)	0,0269

**Tabla 29: Regresión logística múltiple de las interacciones entre ATP7B y ERCC4**

Parámetros	Coefficiente de regresión	OR	IC 95%	Probabilidad
rs2147363	2,9517	19,138	(1,286-284,911)	0,0322
rs1799801	2,5835	13,243	(1,937-90,567)	0,0084
rs2147363- rs1799801	-6,5845	0,001	(<0,001-0,,057)	0,0005
Edad	-0,0389	0,962	(0,866-1,068)	0,4670
Sexo	-0,2953	0,744	(0,069-7,993)	0,8074
Alcohol	-0,4127	0,662	(0,124-3,534)	0,6292
Tabaco	-1,7741	0,170	(0,029-0,999)	0,0498

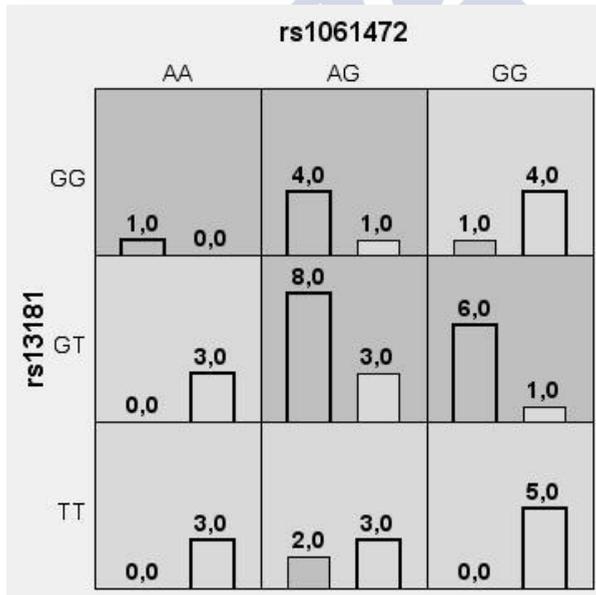
Analizando las interacciones con MDR (Reducción de la Dimensionalidad Multifactorial) que es un modelo genético no paramétrico, alternativo a la regresión logística para la detección y la caracterización de interacciones no lineales, obtenemos los siguientes resultados.

**Tabla 30: Combinaciones con mayor significación en el análisis MDR**

Combinación	CVC <sup>1</sup>	TBA <sup>2</sup>
rs1061472, rs13181	10/10	0,7579

<sup>1</sup>CVC: “Cross-Validation Consistency”: Coeficiente que indica la identificación de un modelo de reducción multidimensional. Oscila entre 1 y 10, siendo 10 el máximo CVC, que indica que en todas las iteraciones llevadas a cabo por el programa ha encontrado la misma combinación. <sup>2</sup>TBA: “Testing Balanced Accuracy”: Coeficiente de la combinación de sensibilidad y especificidad del modelo, que indica la exactitud de la predicción.

De forma gráfica podemos observar que las celdas oscuras representan combinaciones genóticas de alto riesgo, mientras que las de luz menos sombreada como combinaciones genóticas de bajo riesgo y las blancas representan las combinaciones que no se observaron datos. Las columnas en cada casilla representan los casos (columna izquierda) y los controles (columna derecha) que son los respondedores.



**Fig 20: Análisis de la combinación formada por los SNPs rs1061472 y rs13181.**

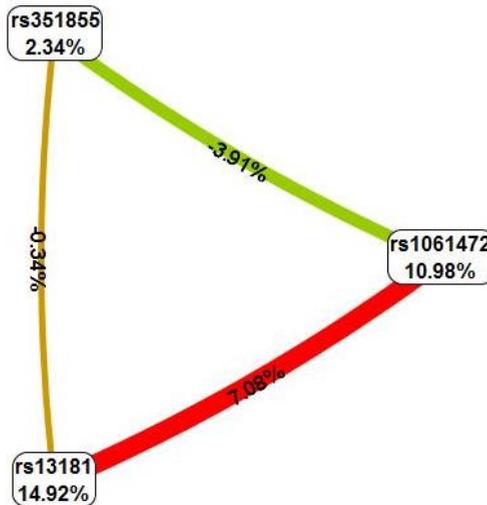
Cada casilla representa una combinación determinada, la gradación de sombra en una casilla representa la probabilidad de asociación con la respuesta de una determinada combinación, los individuos que portan la combinación de la casilla más oscura son los pacientes que responden peor.

La capacidad de predicción de estas combinaciones no es muy elevada porque el número de pacientes es bajo.

Posteriormente, se realizó un análisis de entropía para evaluar qué tipo de efectos estaban representados en este modelo, el gráfico de entropía resultante es el que se muestra en la figura 21. Cada nodo representa un SNP, y el valor de entropía la fuerza del efecto de dicho SNP. La línea que conecta dos SNPs y su valor de entropía representan la interacción entre estos dos polimorfismos y la fuerza de esta interacción.

Un valor positivo de entropía (rojo) indica una ganancia de información o sinergia, lo cual representa interacciones no aditivas entre los SNPs y valores negativos de entropías (azul) indican que existe una pérdida de información como resultado de redundancia entre genes.

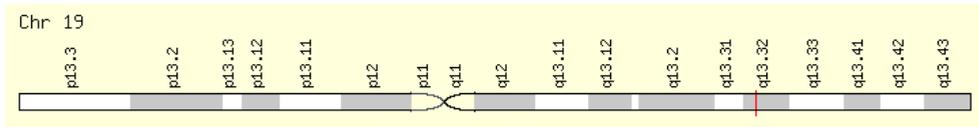
En el gráfico se observa que la interacción entre los SNPs de ATP7B y ERCC2 presenta un valor positivo de entropía, 7,08%, que indica que existe una interacción sinérgica entre estos polimorfismos.



**Fig 21: El análisis de descomposición de la entropía.** Describe el porcentaje de entropía que es explicada por cada SNP y por la interacción entre SNPs, dentro de la población de estudio. Un porcentaje positivo de entropía indica ganancia de información o sinergia. Sin embargo, un porcentaje negativo indica redundancia o pérdida de información.

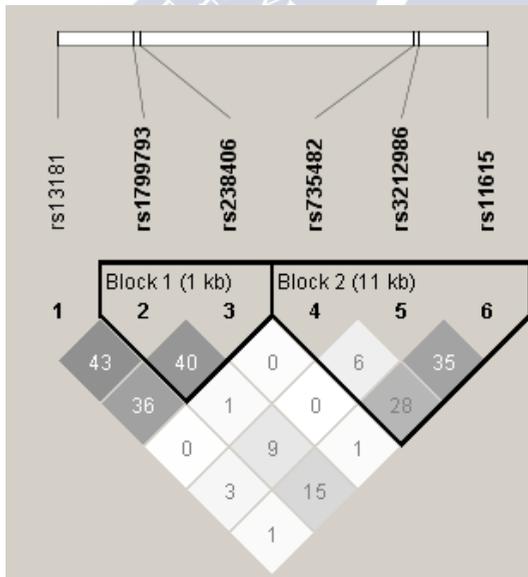
### 5.8 Análisis e identificación de haplotipos

La mayoría de los genes analizados incluían sólo 1-2 SNPs genotipados en este estudio, sin embargo en la región cromosómica 19q13.32 se concentran 6 SNPs (3 de ERCC2, 1 de RPA3A y 2 de ERCC1) parcialmente ligados como se pudo comprobar en haploview y por lo Se usó la librería haplo.stats, implementada dentro de SNPassoc, y se utilizó el análisis de ventana deslizante, el cual busca una región para la cual los haplotipos tienen una asociación más fuerte con un rasgo binario.



**Fig 22: Región del cromosoma 19 donde se localizan los polimorfismos seleccionados**

En el caso de la toxicidad hematológica, se observó que la combinación AGT (rs735482, rs3212986, rs11615, de ERCC1), el haplotipo más frecuente, presente en un 57% tiene un OR de 3.59, IC95% (1.34-9.6), con una probabilidad de 0.01,



**Gráfico 11: Ligamiento de los distintos SNPs utilizando Haploview**

Haciendo el análisis de haplotipos para la variable respuesta se encontró que la zona que mostraba una asociación máxima era la ventana que implicaba a los SNPs rs238406, rs735482 y rs3212986). El haplotipo más frecuente es TGA, presente en un 23% y tiene un OR protector de 0.15, IC 95% (0.02-0.87) con una probabilidad de 0.035.

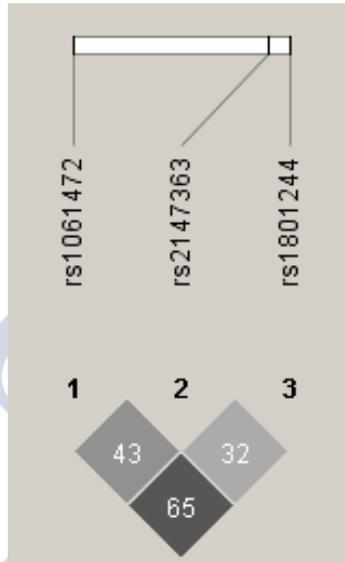


Gráfico 12: Ligamiento de los distintos SNPs del gen ERCC1

## 5.9 Supervivencia

Al analizar la supervivencia correspondiente a los 110 pacientes del estudio se observó una mediana de SG de 48,93 meses (29,92-67,9). No se encontraron diferencias entre la SG ( $p=0,097$ ) y SLP ( $p=0,155$ ) según el estadio III y IV.

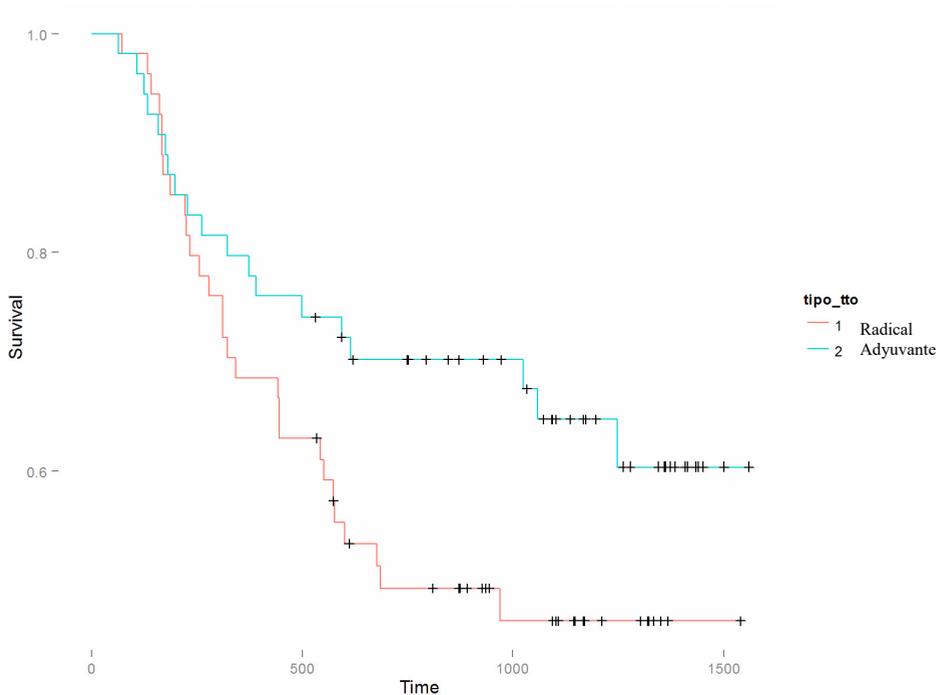


Gráfico 13: Curva Kaplan-Meier según tratamiento

Las mayores diferencias de supervivencia observadas según los parámetros clínicos son las encontradas según el tipo de tratamiento, el grupo de pacientes que recibieron tratamiento adyuvante obtuvieron mejor supervivencia aunque no fue significativo,  $p=0,0807$ , lo mismo ocurre con el sexo, no se alcanza la significación,  $p=0,064$ .

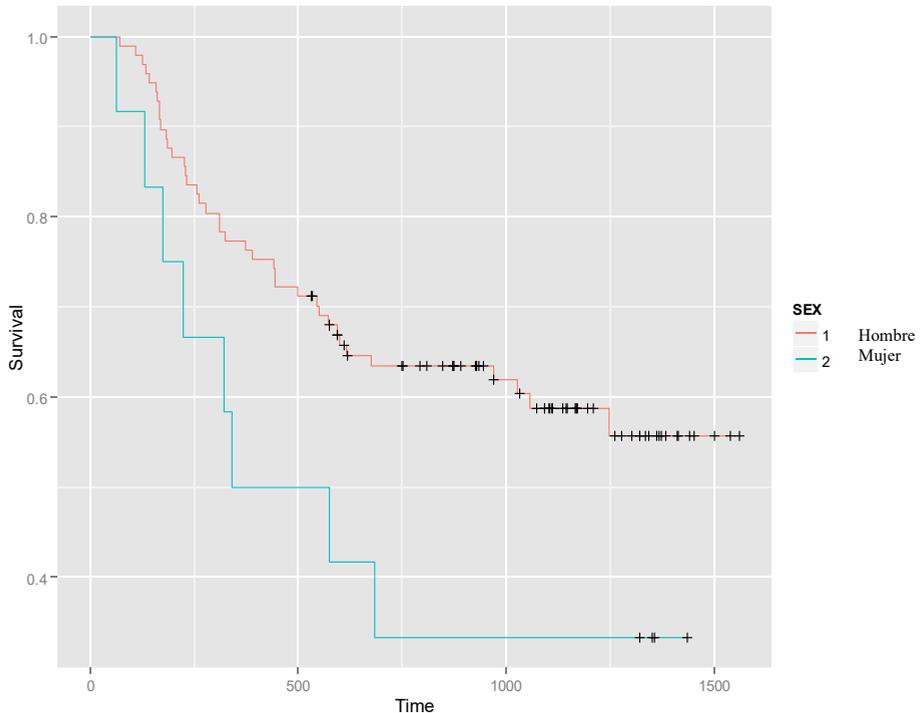


Gráfico 14: Curva Kaplan-Meier según sexo

No se encontraron diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes según la localización primaria del tumor, afectación ganglionar ni con el grado de diferenciación.

Sólo dos de los 36 SNPs analizados (rs12934241 en el gen MMP2 y rs717620 en el gen ABCC2) mostraron una asociación con la supervivencia.

Para el gen MMP2, el grupo de pacientes con el genotipo CC tienen una SLP de 31,5 meses comparado con los 19,8 meses de los pacientes con el genotipo CT+TT,  $p=0,028$ . En el modelo de regresión Cox el genotipo CC mantiene su valor predictivo independiente para la supervivencia.  $p=0,016$ .

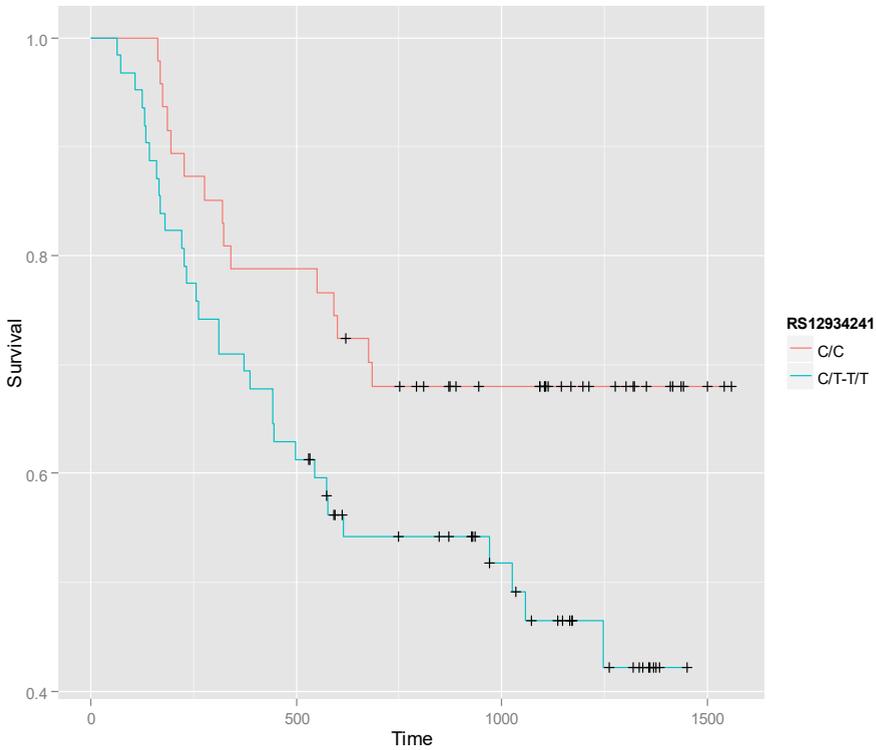


Gráfico 15: Curva Kaplan-Meier para MMP2

Para el gen ABCC2, los pacientes homocigotos GG muestran una supervivencia de 30,96 meses mientras que los pacientes con el genotipo AG+AA es de 15,71 meses,  $p=0,024$ .

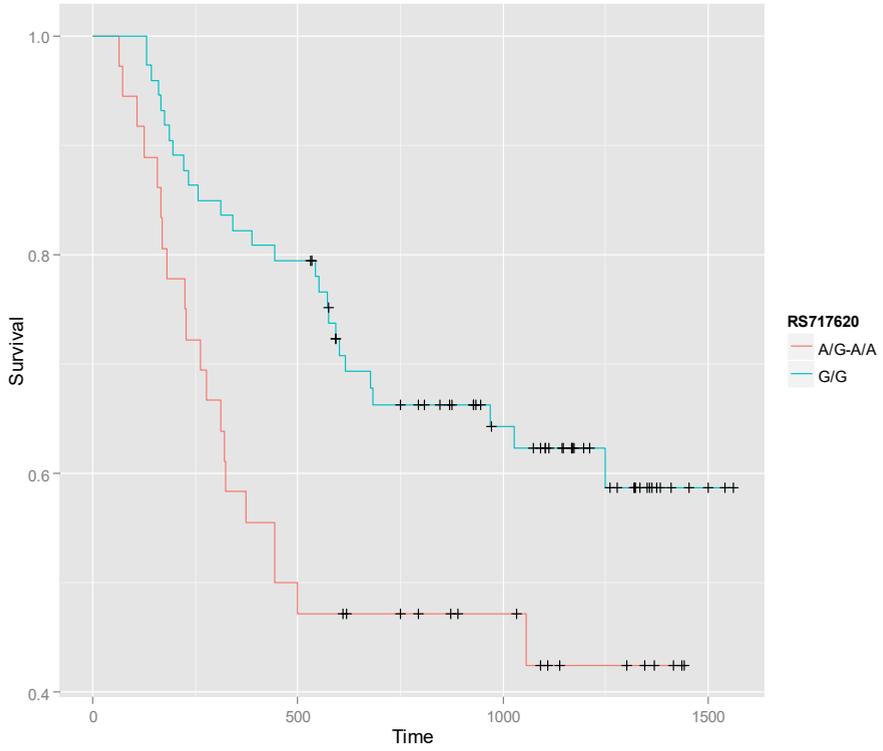


Gráfico 16: Curva Klapan-Meier paraABCC2





## **CAPÍTULO VI**

### **DISCUSIÓN**



El cáncer de cabeza y cuello es un grupo heterogéneo de tumores con una alta tasa de recurrencias tempranas, desarrollo de segundos tumores primarios y mortalidad. En el presente estudio se ha querido validar un panel con genes candidatos que previamente habían sido descritos en la literatura por su asociación significativa en cuanto a toxicidad, eficacia y supervivencia en pacientes con cáncer de cabeza y cuello a tratamiento con cisplatino y radioterapia concomitante.

En primer lugar, algunos de los resultados positivos publicados en la literatura no se replicaron en nuestro conjunto de datos. Las principales razones pueden ser: diferente estadio de los pacientes, diferente distribución de los datos demográficos del paciente (edad, sexo, etnia y la prevalencia del tabaquismo), diferentes tratamientos, y diferente distribución de las localizaciones anatómicas entre estudios y tamaño muestral.

Los CECC al albergar diversas localizaciones tiene como ventaja aumentar el tamaño muestral pero lo ideal sería analizar por separado el comportamiento de los distintos grupos para obtener una muestra más homogénea y valorar el efecto de los resultados en cada una de las localizaciones.

El grupo de pacientes analizado presentó una edad media similar a las series descritas en otros estudios, al igual que ocurre con la proporción entre hombres y mujeres (113). En cuanto a la localización tumoral las tasas de incidencia de la cavidad oral están aumentando y esto puede ser debido al consumo de tabaco, en nuestro estudio un 22,7% de los pacientes presentaban esta localización y un 68% eran fumadores (114).

En cuanto al estado funcional del paciente nuestro estudio es similar al de los ensayos publicados (115), la mayoría presentaban un PS entre 0-1 (98,2 %), lo que nos impide analizar si el pronóstico empeora con el estado funcional.

Con respecto al tamaño tumoral, en nuestro estudio encontramos que un 61,3% de los pacientes presentaba lesiones avanzadas (T3 y T4) en el momento del diagnóstico, al igual que Bernier y cols. en el que un 66% de sus pacientes presentaban tumores en T3 y T4 (76). No hemos encontrado diferencias en cuanto a presentar mayor probabilidad de recidiva según la extensión, alrededor de un 35% de los pacientes tanto T1-2 como T3-4 presentaron recidivas.

El número de ganglios linfáticos cervicales positivos no mostró significación con la presencia de recidivas ni con la supervivencia. Tampoco se han observado estas diferencias según el estadio ni con el grado de diferenciación.

Una de las posibles causas puede ser que el tamaño muestral sea pequeño o que la mediana de seguimiento sea demasiado corta y se necesite más tiempo para observar estas diferencias.

Son varios los estudios que han investigado la asociación de los polimorfismos con el riesgo de padecer cáncer, siendo los más exhaustivos los que presentan una mayor incidencia como son el de pulmón, mama y colon. En el cáncer de cabeza y cuello también podemos encontrar numerosos estudios (116-118) que intentan correlacionar la alteración de genes de reparación del ADN con el riesgo de presentar CECC debido a que el sistema de reparación del ADN tiene como objetivo mantener la integridad genómica y desafiar a las agresiones ambientales y a los errores de replicación.

El tratamiento estándar en los pacientes de CECC localmente avanzado es la modalidad combinada de cisplatino y radioterapia, todos los pacientes del estudio han recibido este tratamiento. La radioterapia ejerce su efecto citotóxico por roturas de cadena doble y sencilla en el ADN, pero también mediante las alteraciones que los radicales de oxígeno producen en las bases nitrogenadas. Por esta razón se cree que las vías de reparación del ADN deben ser uno de los mecanismos más importantes para defender a la célula de la radiación ionizante y los polimorfismos que alteran la capacidad funcional de estos genes pueden ser uno de los grandes determinantes de las diferencias interindividuales que se observan tanto en la respuesta al tratamiento como en el desarrollo de toxicidades. Puesto que las lesiones que produce este tipo de radiación en el ADN son muy diversas, todos los mecanismos de reparación han sido ampliamente estudiados.

En este estudio se han analizado 36 SNPs en 110 pacientes, a continuación se discutirán los resultados más relevantes en relación a los objetivos propuestos.

## **1. Mecanismos básicos de reparación del ADN**

### **Genes de reparación del mecanismo NER**

Hoy en día es indiscutible el papel de los SNPs en genes que codifiquen para el mecanismo NER sobre toxicidad y respuesta. La ausencia o disminución de la función enzimática de la

maquinaria reparativa NER, ha sido correlacionada en diversos tipos de cánceres.

La proteína de complementación cruzada de reparación por escisión de endonucleasas 1 (ERCC1) específica de estructura, junto con su proteína compañera del grupo F de XP (XPF), es responsable de una etapa tardía esencial en NER, en el que marca la cadena dañada de ADN en el punto 5' de la lesión por cisplatino distorsionadora de la hélice.

Además, la nucleasa específica de estructura de ERCC1/XPF (119) también desempeña una función en la reparación de recombinación homóloga de los entrecruzamientos intercatenarios (120).

ERCC1 ha sido el gen más estudiado, diez estudios han examinado la asociación entre este polimorfismo y la respuesta a regímenes que contienen platino en cáncer de pulmón. En el metanálisis de Yin y cols. no encontraron una relación significativa entre ERCC1 C354T (rs11615) y respuesta a fármaco (OR=1,20, IC95%: 0,75-1,93, p=0,44), y cuando estratificaron los resultados según la etnia los datos fueron similares tanto en caucásicos como en asiáticos. Lo mismo ha ocurrido para otro polimorfismo de ERCC1:8092C>A (rs3212986) (OR=1,43, IC95%:0,45-4,58, p=0,54)(121).

Varios artículos sugieren que ERCC1(rs11615) es clave en NER y que puede ser un marcador predictivo de respuesta a terapias basadas en la combinación de platino con radioterapia. En el estudio de Metzger y cols. (122) los pacientes con el genotipo CT fueron identificados como predictores de respuesta a la terapia neoadyuvante con radioquimioterapia en cáncer de esófago (p<0,001) y con una mayor supervivencia a los 5 años (51%).

En este estudio, el polimorfismo en ERCC1 (rs 11615) se encuentra en el codón 118 (C118T) y se asocia con la reducción de expresión mRNA ERCC1 y niveles de proteína (123).

Aunque el polimorfismo en ERCC1 analizado representa una mutación silenciosa, parece jugar un papel central en los mecanismos de resistencia. El cambio de C a T en el codón 118 convierte un codón común (AAC) a un codón menos utilizado (AAT), ambos codifican para asparragina. Este cambio se traduce en una disminución de la expresión del gen ERCC1, que dificulta la actividad reparadora. Un aumento de expresión de ERCC1 podría estar relacionado con una mejor reparación del ADN y una peor respuesta a la terapia (124).

Sin embargo, en el estudio de Bradbury y cols. no encontraron una asociación con la respuesta

en pacientes con cáncer de esófago a tratamiento neoadyuvante con quimiorradioterapia para ERCC1 rs11615, sólo encontraron una significación en SLP ( $p < 0,0007$ ) y SG ( $p < 0,0001$ ) para ERCC1 rs3212986 y un incremento del riesgo de recurrencia para los pacientes con el genotipo CC comparado con los pacientes CA o AA, mientras que los datos fueron contradictorios para el cáncer de pulmón avanzado, ya que los pacientes con el alelo A fueron asociados con pobre supervivencia (125). En nuestro estudio no se observó ninguna correlación con la respuesta ni supervivencia para cada uno de los SNPs de ERCC1 analizados. Nuestros datos están en concordancia con varios estudios previos, en los que no encontraron ninguna relación entre el genotipo CT de ERCC1 118 con respuesta terapéutica ni con supervivencia (126, 127), ni riesgo de recurrencia (128).

En cuanto a toxicidad, son pocos los estudios previos que analizan el efecto de los distintos SNPs del gen ERCC1 y los resultados son en algunos casos discrepantes. En el estudio de Chen y cols. no encontraron una correlación entre ERCC1 C118T y toxicidad hematológica ( $p=0,269$ ) o gastrointestinal ( $p=0,343$ ). En cuanto a la toxicidad hematológica los grupos establecidos fueron poco restrictivos, toxicidad  $\geq 1$  o grado 0, este puede ser uno de los motivos que hacen que no se pueda comparar con nuestro estudio (126), ya que el criterio de selección era presentar para los casos una toxicidad hematológica G2-3.

En nuestro estudio, el alelo C del rs11615, se asoció como factor protector de toxicidad hematológica bajo el modelo dominante (OR=0,29, IC95%: 0,12-0,71;  $p=0,0066$ ) y el aditivo. Recientemente se ha publicado que el genotipo CC de ERCC18092 desarrolla más trombocitopenia y náuseas/vómitos que los pacientes que presentan al menos un alelo A (129). Por otra parte, en nuestro estudio, el alelo G del rs3212986 se asoció como factor protector de disfagia bajo el modelo aditivo (OR=0,49, IC95%: 0,25-0,94;  $p=0,0324$ ). Hasta la fecha, la mayoría de los estudios publicados no observaron asociaciones entre los genotipos de ERCC1 y la aparición de efectos adversos relacionados con el tratamiento; sin embargo, se han reportado algunos resultados en el cáncer de ovario (130) y pulmón (131). Esto puede indicar que la importancia biológica de los SNPs depende del tejido, como ha sido el caso de otros biomarcadores.

Otro de los genes participantes en esta vía es XPD (ERCC2), el cual se localiza en el cromosoma 19q13.3 y codifica para una proteína que constituye una subunidad del factor de transcripción IIIH (TFIIH) esencial para el adecuado funcionamiento del mecanismo de reparación NER. Aún no se ha comprendido en su totalidad, el efecto sobre la función de XPD, de las variantes polimórficas en la secuencia del gen, sin embargo, las variantes Asp312Asn y Lys751Gln están asociadas con la disminución en la capacidad de reparación y con el aumento de la susceptibilidad al cáncer (132).

Uno de los polimorfismos genéticos de ERCC2, es el SNP que causa un cambio de aminoácido en el codón 751 (Lys a Gln), rs13181, se ha visto que los pacientes homocigotos para esta variante de genotipo tienen una capacidad de reparación del ADN subóptima y por tanto, serían más sensibles a los compuestos derivados de platino (133).

El polimorfismo rs13181, ubicado en el exón 23, es una sustitución de A por C, que resulta en una sustitución Lys751Gln en el dominio de interacción entre la proteína ERCC1 y su activador helicasa dentro del complejo TFIIH, que indica una posible participación de este SNP en la actividad defectuosa de la proteína.

El polimorfismo XPD Asp312Asn ubicado en el exón 10, resulta de una sustitución de G por A, ha sido altamente conservado a lo largo de la evolución, lo que sugiere que guarda un significado funcional (134).

Los tres SNPs de nuestro estudio producen un cambio de aminoácido que conlleva a una alteración de la función de la proteína, de modo que los individuos portadores de las variantes polimórficas presentarán una capacidad de reparación del ADN disminuída.

Se han realizado numerosos estudios para tratar de esclarecer una posible asociación de estos SNPs con la eficacia, en términos de respuesta y supervivencia. Song y cols. (128) encontraron que bajo el modelo dominante los pacientes de orofaringe con el polimorfismo XPD rs1799793 Asp/Asp, presentaban peor SLE ( $p=0.00008$ ) y mayor riesgo de recurrencia. Sin embargo no encontraron diferencias para el SNP XPD- rs13181,  $p=0,100$ .

Por el contrario, en el estudio de Gal y cols. observaron que los pacientes con carcinoma oral escamoso con el genotipo CC del XPD Lys751Gln tenían una tendencia como predictores de bajo riesgo de presentar segundos tumores primarios (HR 0.17, 95% CI 0.02-1.29), pero no encontraron ninguna relación con la SG ni SLP (97). En pacientes con cáncer de pulmón tratados con platino, no encontraron una asociación significativa entre ERCC2 Lys751Gln y

supervivencia, los pacientes con el genotipo AA tuvieron una mediana de supervivencia de 26,5 meses vs 17,0 meses para los pacientes heterocigotos AC ( $p=0,542$ ) (135). Nuestros datos están en concordancia con estos estudios, no hemos encontrado ninguna relación entre los SNPs de ERCC2 y supervivencia, por otra parte, otros estudios muestran datos contrarios.

En el estudio de Bradbury y cols. dos SNPs, XPD Asp312Asn (rs1799793) y XPD Lys751Gln (rs13181) fueron asociados con SG y SLP en pacientes tratados con cisplatino con cáncer de esófago (125). Otro estudio similar en pacientes con cáncer de cabeza y cuello encontraron la misma asociación con estos SNPs y SG (96).

En un reciente estudio publicado en pacientes con CECC estadio III-IV tratados con RDT con el genotipo AA del XPD Lys751Gln presentaron una peor SG (HR=1.66, IC95% 1.15-2.40;  $p=0,0013$ ) que los pacientes con al menos un alelo C (136). En pacientes *naïve*, a tratamiento con QT de inducción basada en cisplatino, los pacientes con el alelo C presentaban una mayor supervivencia que los homocigotos AA,  $p=0,0012$  (137).

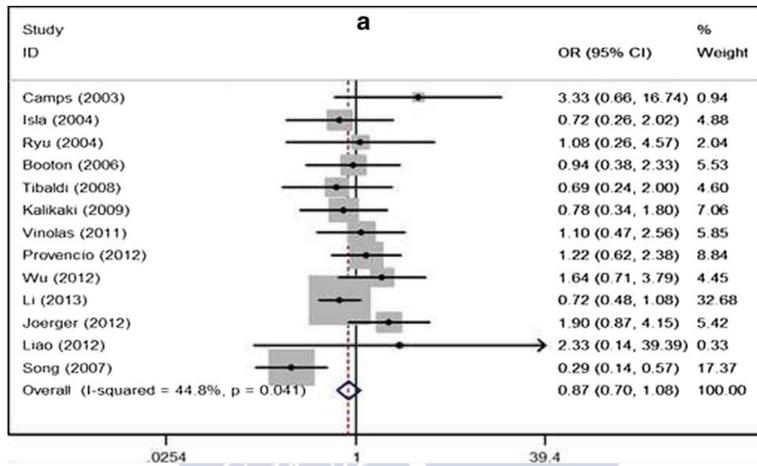
Por el contrario, en el estudio de Chen y cols. observaron que los pacientes con el genotipo AA presentaban una mayor SG ( $p=0,019$ ) y que podía ser un marcador de buen pronóstico en el subgrupo de pacientes ancianos (138).

Para XPD Asp312Asn los datos relacionados con supervivencia son escasos, los pacientes con el genotipo GG obtuvieron una mediana de supervivencia de 16,3 meses, muy similar a la de los heterocigotos GA (15,2 meses), mientras que para la variante homocigota AA fue de 6,6 meses,  $p=0,003$  (139) en pacientes con cáncer de pulmón tratados con platino. Por el contrario, en el estudio de Sullivan y cols. no encontraron ninguna correlación entre los rs13181 y rs1799793 del gen ERCC2 y la supervivencia tanto en pacientes con estadio III y IV de cáncer de pulmón (140).

En cuanto a la tasa de respuesta, hemos encontrado tres polimorfismos en el gen ERCC2, en los codones 156, 312 y 751 que pueden estar relacionados con la respuesta. Para el rs1799793, el 70,6% de los pacientes con el genotipo GG han tenido respuesta completa mientras que el 43,5% con el genotipo AG y el 22,2% con el genotipo AA,  $p=0,0194$ . En el caso de XPD rs13181, los pacientes que tenían al menos un alelo G dominante (GG o GT) mostraban una menor tasa de respuestas completas que los que presentan el genotipo TT, (35,0% vs 68,8%);  $p=0,0368$  y para el rs238406, los pacientes con el genotipo GG mostraron

una menor tasa de respuestas completas que los que tienen el genotipo GT o TT, (27,3% vs 52,8%);  $p=0,0231$ .

En el siguiente meta-análisis (141), podemos ver que para los 13 estudios analizados se encontró una asociación significativa entre el polimorfismo Asp312Asn de ERCC2 y la tasa de respuestas (para Asp + Asn vs Asn/Asn, OR = 0,87; IC del 95% = 0,70 a 1,08;  $I^2= 44, \%$ ,  $p= 0.04$ ).



**Fig 23:** Forest plot del meta-análisis realizado al SNP rs1799793 (Asp312Asn) y la tasa de respuestas en pacientes tratados con platino. Un  $OR < 1$  denota que los pacientes con la variante Asn tienen una respuesta desfavorable.

Los efectos sinérgicos entre estos tres polimorfismos de ERCC2 pueden influir en la respuesta, esperamos que en estudios futuros con muestras de mayor tamaño ayuden a esclarecer esta posibilidad.

Por otra parte, otros estudios no encontraron una correlación entre XPD Asp312Asn y beneficio clínico (categorizado como RP o EE),  $p = 0.502$ , y con respecto al polimorfismo XPD Ly751Gln, tampoco encontraron diferencias entre los distintos genotipos,  $p=0,517$  en pacientes con cáncer de pulmón tratados con cisplatino-gencitabina (142). En el estudio de Tibaldi y cols. el beneficio clínico fue definido como RC, RP y EE, en el cual no encontraron ninguna asociación entre XPD Asp312Asn y Lys751Gln ni con SLP y SG (143).

La mayoría de los ensayos se llevaron a cabo en pacientes con distintos regímenes basados en platino, con distintas categorías para definir beneficio clínico, que no permiten obtener conclusiones definitivas.

En cuanto al papel de ERCC4, nosotros encontramos que el alelo C es un factor protector de toxicidad hematológica, OR=0,39; IC95% (0,17-0,91), p=0,0286 en el modelo dominante, en la literatura los únicos estudios publicados para este gen son en cáncer de pulmón y encuentran que sólo un SNP sinónimo, rs1799801, localizado en el cromosoma 16 del gen ERCC4 (p.Ser835Ser) estaba correlacionado con la tasa de respuestas, los pacientes con la variante TT mostraban una menor respuesta que los que presentaban el genotipo CT+TT (25.0% vs 44.7%; OR: 3.30; 95% CI: 1.19–10.00; p = 0.021) bajo el modelo dominante (140) y no encontraron ninguna asociación con la toxicidad.

En nuestro estudio no hemos encontrado ningún dato que relacione a ERCC5 (rs17655) con toxicidad o eficacia, pocos son los estudios publicados al respecto y con datos contradictorios, En el estudio de Caiola y cols. en pacientes con cáncer de ovario encontraron que los pacientes con el genotipo CC diagnosticados en estadios tardíos (III-IV) presentaban una mejor SLP y SG comparado con los pacientes con el genotipo CC+CG (144).

### **Genes de reparación del mecanismo BER**

La proteína XRCC1, sin actividad enzimática conocida, actúa como una chaperona, favoreciendo las interacciones con otras enzimas que participan en la reparación de roturas de cadena simple.

El polimorfismo del codón 399 de XRCC1 ha sido bastante estudiado y se ha demostrado que está relacionado con la respuesta a los agentes de platino, actúa reparando el daño inducido por el cisplatino e induciendo la apoptosis celular si no es capaz de repararlo. Una alteración en su funcionamiento lleva a una mayor actividad del agente platinado.

Este polimorfismo consiste en un cambio de una base en el codón 399 del exón 10 del gen y se ha observado que los pacientes con el genotipo salvaje Arg/Arg responden mejor al tratamiento y que los pacientes con el genotipo G/A y A/A pueden influir en la supervivencia global (145).

Existen varios estudios sobre la funcionalidad que indican que hay una asociación del alelo variante 399Gln con incrementos en la sensibilidad a la radiación ionizante y a un mayor

número de roturas en el ADN que sugieren una menor eficacia de la reparación (146).

La mucositis y la radiodermatitis son las principales complicaciones que se producen durante la QRDT en pacientes con CCC. La asociación entre la radiosensibilidad severa y los síndromes genéticos como la anemia de Fanconi, ataxia-telangiectasia... nos proporciona una prueba de que el componente genético puede estar detrás de las reacciones agudas en el tejido normal (147).

Existen tres ensayos (148-150) que evaluaron el riesgo de mucositis grave ( $G \geq 2$ ) y encontraron una asociación con el alelo G de XRCC1, en pacientes tratados con RDT sólo o QRT (OR=4,02; IC95%:1,16-13,90,  $p=0,025$ ).

Cabría pensar que como la vía BER también participa en la reparación del ADN lesionado por radiaciones ionizantes, encontraríamos algún gen asociado con la toxicidad, pero nuestros datos no han encontrado ninguna asociación con este gen en términos de eficacia y toxicidad. Los análisis presentan la dificultad adicional de que otros genes de reparación también localizados en el brazo largo de cromosoma 19 (ERCC1, ERCC2) puedan contribuir a contrarrestar el efecto del polimorfismo XRCC1.

### **Reparación por recombinación de roturas de la doble cadena**

El gen XRCC3 (X-ray repair cross complementation Group 3) se localiza en la región 14q32.3. La proteína XRCC3 es un miembro de la familia de proteínas relacionadas con RAD51, que participa en la reparación de roturas de doble cadena del ADN a través del mecanismo de recombinación homóloga, fundamental para el mantenimiento de la integridad cromosómica (151).

El polimorfismo más estudiado de este gen es la sustitución de citosina por timina en el exón 7, lo que supone el cambio de treonina (Thr) por metionina (Met) en el codón 241.

Haciendo un breve repaso de los estudios publicados, algunos autores encuentran que la disfagia aguda fue asociada con el alelo T de XRCC3 (722 C>T)  $p=0,03$  y el alelo G para XRCC6 (1310 C>G)  $p=0,014$  (150). Otros señalan que RAD51 (rs1801320) CC+GC está asociado con riesgo de disfagia severa (148), aunque tenemos también estudios negativos (150, 152, 153).

En nuestro estudio no se ha encontrado ninguna asociación con los genes involucrados en esta vía de reparación, el único resultado positivo ha sido el del gen RAD51 (rs1801320) con

neutropenia, los pacientes con el genotipo GG muestran menos frecuencia de neutropenia G2-3 que los que presentan el genotipo CG o CC (19% vs 46,6%; OR=3,72; IC95%: (1,17-11,86),  $p=0,0265$ ) bajo el modelo dominante. Estos datos se correlacionan con los encontrados con Khrunin y cols. en pacientes con cáncer de ovario tratadas con cisplatino (154).

## 2. Transportadores de membrana

Uno de los mecanismos de quimiorresistencia es el que incluye la expulsión de fármacos de la célula mediante proteínas transportadoras o bombas de eflujo, como son la superfamilia ABC pero también tienen un papel destacados las ATPasas de tipo P (ATP7A y ATP7B).

Aunque no pertenecen a la familia ABC, los transportadores de cobre, ATP7A Y ATP7B podrían estar involucrados en la resistencia a la quimioterapia.

Un mecanismo importante de la resistencia a platino es la disminución de su concentración efectiva en la célula, debido a una disminución en la captación del fármaco como a un aumento en la excreción del mismo.

Existen tres mecanismos concebibles que podrían explicar la resistencia del tumor al platino mediada por ATP7B: expulsión activa, el secuestro del fármaco mediante la unión a la proteína, y cambios en la concentración intracelular de cobre (155). Una disminución de la expresión de ATP7B se relaciona con una menor captación de platino y una mayor resistencia a estos compuestos en líneas celulares. Los hallazgos encontrados en este estudio proporcionan nuevos SNPs en ATP7B que pueden estar relacionados con la toxicidad a la terapia basada en platino.

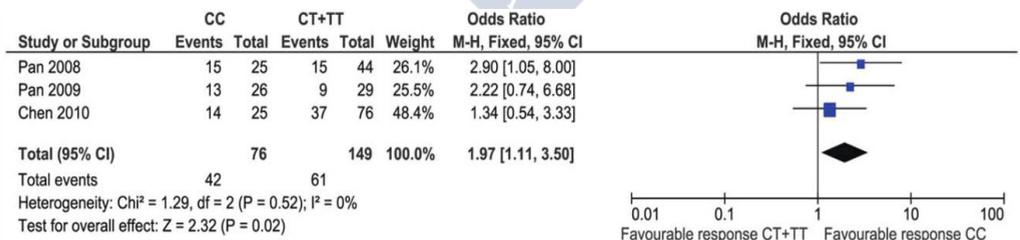
En cuanto a la presencia de disfgia, se encontraron dos SNPs en el gen ATP7B, el rs1061472 en el que el alelo A se asoció como factor protector de disfgia y el rs1801244 en el que el alelo G se asoció como factor protector de disfgia bajo el modelo de herencia dominante, y para el rs2147363, los pacientes con el alelo T presentan menos neutropenia grave. Revisando la estudios publicados en relación a este transportador y la presencia de toxicidades con la quimioterapia, sólo he encontrado un artículo en el que asocian la presencia de toxicidad

gastrointestinal G3-4 con el genotipo AA del SNP rs1061472 en 808 pacientes de cáncer de ovario a tratamiento con carbotaxol (156), y esta toxicidad se relacionaría más con el taxano.

Con respecto a la excreción, las proteínas de resistencia múltiple a fármacos (*multidrug resistant proteins*, MRP) actúan como bombas de excreción dependientes de ATP para varios compuestos entre los que se incluye el cisplatino, siendo causantes de resistencia al mismo.

Nuestros resultados muestran que para el rs1045642 localizado en el gen ABCB1 existe una correlación con la respuesta, los pacientes con el alelo T muestran una peor tasa de respuestas que los pacientes con el genotipo CC. Sin embargo, estos datos no han sido observados en el estudio de Marsh y cols. en pacientes con cáncer de ovario tratadas con platino (157).

Los únicos datos de respuesta publicados son los relacionados con la supervivencia, en pacientes con cáncer de esófago tratados con QRDT (158) encuentran que el alelo T para el rs1045642 estaba asociado con mayor supervivencia (HR=0.44; IC95%:0.23-0.85) y reducción del riesgo de recurrencias (HR=0.25; IC95%:0.10-0.64). Posteriormente en el estudio de Lamba y cols. en pacientes con cáncer de pulmón a tratamiento con carboplatino no encuentran una asociación con la SG ni con la SLE (159). Por otra parte, en un meta-análisis de 419 individuos describen una relación entre ABCB1 C3435T y la respuesta a la QT basada en platino en pacientes con cáncer de pulmón, en la que el alelo C presenta mayores tasas de respuestas, esta significación no fue observada con la SG (160). Estos resultados se confirmaron posteriormente en otro meta-análisis (121) pero sólo en pacientes asiáticos.



**Fig 24: Forest plot del reciente meta-análisis realizado al SNP rs1045642 (C3435T) y la tasa de respuestas a la terapia basada en platino en individuos caucásicos.** ORs específicas de estudio (cuadrados) e IC al 95% (líneas) calculadas para cada colección individual. La OR conjunta (rombo) e IC al 95% se calculó combinado todas las bases de datos

En nuestro estudio además hemos encontrado varias asociaciones entre distintos SNPs de ABCB1 y toxicidad. Los pacientes con el genotipo TT para el rs2032582 presentaban más toxicidad hematológica y neutropenias graves y para el rs1045642, los pacientes con el genotipo TT presentaron más riesgo de mucositis que los que tenían el genotipo CC+CT. Son escasos los estudios que intentan correlacionar los diferentes SNPs de ABCB1 y toxicidad, hasta la fecha, la mayoría de los estudios fueron llevados a cabo en pacientes con cáncer de ovario, donde encuentran que los pacientes homocigotos para el alelo T presentan más riesgo de neutropenia o una disminución del recuento absoluto de neutrófilos en el nadir.

En cuanto a ABCC1 o MRP1, es la primera proteína descrita en esta familia y la más estudiada, fue descubierta en 1992 en una línea celular de cáncer de pulmón multiresistente que no expresaba PgP. La mayoría de los polimorfismos MRP1 / ABCC1 tienen una frecuencia muy baja (<5%), lo que indica que es un gen altamente conservado. La mayoría de los polimorfismos identificados están situados en la región no traducida (UTR), intrones y en la región codificante. Transporta conjugados de glutatión y puede actuar como una bomba expulsando a los fármacos conjugados fuera de la célula, muchos autores implican a MRP1 en la resistencia a cisplatino.

Otro hallazgo significativo ha sido que los pacientes con el genotipo CC del SNP rs246221 del gen ABCC1 tienen más riesgo de toxicidad hematológica y neutropenia G3-4, estos datos son similares a los publicados por Vulsteke y cols. pero en pacientes con cáncer de mama a tratamiento con FEC (161).

La proteína relacionada con la resistencia a múltiples fármacos MRP2 (ABCC2) es una proteína de 190 kDa, localizada en el cromosoma 10q24 que pertenece a la familia de las proteínas MRP (*"multidrug resistance associated protein"*) que confieren resistencia a las células tumorales frente a fármacos por expulsión activa de éstos desde el interior celular. MRP2 induce resistencia al cisplatino al eliminarlo de la célula conjugado con glutatión (GSH). Se expresa en muchos tejidos tumorales y las células que sobreexpresan MRP2 podrían adquirir multiresistencia a fármacos. Se ha observado una correlación entre los niveles de mRNA y resistencia a cisplatino que sugieren que MRP2 puede contribuir a la resistencia de los tratamientos con este fármaco (162). Nuestros resultados indican que los

pacientes homocigotos GG muestran una mayor supervivencia que los pacientes con el genotipo AG+AA,  $p=0,024$ .

Similares resultados fueron obtenidos en cáncer de pulmón, los pacientes con el genotipo GG mostraron una mejor tasa de respuestas al tratamiento con cisplatino comparado con los que tenían la variante alélica T,  $p=0,032$  (163).

Por el contrario, en el estudio realizado con población asiática en cáncer de pulmón (164) encuentran que los pacientes que contienen la variante alélica A fueron mejores respondedores a la quimioterapia con cisplatino que los GG,  $p=0,002$ . Sin embargo, en el estudio de Yang y cols. no encuentran esta asociación con la respuesta y la variante alélica A en pacientes con cáncer de ovario a tratamiento con cisplatino (165).

El significado biológico de esta asociación se desconoce, una de las teorías que pueden explicar estos resultados es que además de la exportación de platino, la sobreexpresión de ABCC2 está asociada con una disminución de aductos de platino-ADN y que esta disminución está acompañada por una aceleración de re-entrada acelerada en el ciclo celular después de la detención de G2 inducida por cisplatino y a una resistencia a experimentar apoptosis en líneas celulares resistentes a cisplatino. Una explicación alternativa para los portadores con el alelo A y su asociación con peor tasa de respuestas, es que una disminución de la expresión de ABCC2 puede conducir a una sobreexpresión de ABCC1, el cual puede producir resistencia al platino.

Estas discrepancias en los resultados pueden deberse a los diferentes regímenes de quimioterapia utilizados y poblaciones estudiadas y que el efecto de este polimorfismo no está claro, es necesario elucidar estas discrepancias. Además son pocos los estudios que han analizado el papel de los transportadores en el contexto del cáncer de cabeza y cuello. La diferente metodología empleada y la falta de estudios prospectivos ha dificultado la obtención de conclusiones sólidas y resultados a veces contradictorios.

### 3. Detoxificación

Una vez en el interior de la célula, los fármacos pueden ser inactivados por oxidación y/o conjugación con glutatión. Las *glutatión S-transferasas* (GST) conjugan el glutatión con varios xenobióticos o fármacos desempeñando un papel muy importante en la detoxificación.

Las enzimas GST están implicadas en el metabolismo del platino y los polimorfismos de la familia GST pueden afectar a la eficacia del platino mediante la reducción de las concentraciones intracelulares de fármaco (166).

La clase GSTP1 presenta un polimorfismo consistente en la sustitución A>G en la posición 313 del exón 5, causando un cambio de aminoácido en la proteína (isoleucina por valina) y con ello una disminución de la actividad catalítica (167).

La asociación entre el polimorfismo GSTP1 y el riesgo de CCC se ha investigado en muchos estudios pero con resultados controvertidos. Algunos sugirieron que los polimorfismos genéticos de GSTP1 podían influir en el equilibrio entre la activación metabólica y la detoxificación de carcinógenos (168, 169), sin embargo, en el reciente meta-análisis de Lang y cols. no encuentran una asociación entre el polimorfismo GSTP1 Ile105Val y el riesgo de CCC (170).

Se ha estimado que aproximadamente el 50% de las personas tienen uno o dos alelos valina (171), y que los individuos con esta variante tienen una actividad enzimática reducida y que deberían ser buenos respondedores debido a la disminución de la detoxificación de los agentes de platino. Se sugiere que esto podría ocurrir debido a la reducción del metabolismo y la eliminación más lenta del fármaco, lo cual produciría un efecto citotóxico prolongado y que esto podría llevar a una mejor respuesta al tratamiento y supervivencia del paciente. En nuestra serie, los pacientes con la variante valina no mostraron tener una mejor respuesta al tratamiento, probablemente debido a que el tamaño muestral era demasiado pequeño para identificar este efecto, sería interesante ampliar la muestra para confirmar los resultados.

Por otra parte, varios artículos han estudiado el papel de GSTP1 y la presencia de toxicidades a los diferentes agentes quimioterápicos, incluido el platino y en distintas patologías.

En pacientes con cáncer de ovario a tratamiento con platino, encontraron que los pacientes con el genotipo AA mostraban mayores tasas de toxicidad hematológica (78,7%) que los que

tenían el genotipo AG o GG (54,2%),  $p=0,015$  (172). Esta misma asociación también fue observada en pacientes con cáncer de recto a tratamiento con RQT (173) y en pacientes con cáncer de pulmón con QT basada en platino (106).

En nuestro estudio hemos observado que el polimorfismo rs1695 del gen GSTP1, el alelo G se asoció significativamente como factor protector de disfagia tanto en el modelo dominante (OR=0,20, IC95%: 0,08-0,50,  $p=0,0004$ ) como en el aditivo ( $p=0,005$ ). Las asociaciones derivadas de los estudios anteriores apoyan el postulado de que los pacientes con el genotipo AA tratados con QT basada en platino pueden tener un alto riesgo de toxicidad comparado con pacientes con el genotipo AG o GG.

Por el contrario, Yoon y cols. encuentran que en pacientes con cáncer de esófago a tratamiento con QRDT basada en platino, la presencia de un alelo G tiene más riesgo de toxicidad relacionada con disfagia y dolor, que los pacientes homocigotos AA,  $p=0,005$  (31% vs 0%). La evidente limitación de este trabajo es que el tamaño muestral era muy pequeño (72 pacientes), englobaba dos toxicidades juntas y la hipótesis de sus hallazgos estaba basada en un análisis funcional de la proteína en células de glioma, en el que el alelo G mostró una actividad menor por el sustrato en comparación con el alelo A (174).

#### 4. Metaloproteasas

Las metaloproteasas constituyen una familia de proteasas dependientes del zinc y que están implicadas en muchos procesos, entre ellos la carcinogénesis. Son las principales mediadoras observadas en el microambiente tumoral durante la progresión del cáncer.

MMP2 degrada el colágeno y es expresada en condiciones normales por las células del estroma de la mayoría de los tejidos. La sobreexpresión de MMP2 es indicador de un pronóstico desfavorable al degradar el colágeno tipo IV localizado en las membranas basales e inducir la expresión de factores angiogénicos (175).

Otros investigadores han reportado que la expresión de MMP2 es indicador de mal pronóstico para SG (176), Yorioka y cols. observaron que los pacientes que presentaban una actividad elevada de MMP2 en muestras tumorales de la cavidad oral tenían una SLE más corta (177) mientras que otros autores no encuentran esta asociación (178), por ello, se realizó un meta-

análisis reciente basándose en los resultados de 11 estudios con una población de 1439 pacientes concluyendo que la expresión de MMP2 es un factor de mal pronóstico para la supervivencia (179).

La mayoría de los genes que codifican las MMP, incluyendo MMP2, son altamente polimórficos y poseen variaciones de secuencia en sus regiones reguladoras (180). Hay una fuerte evidencia de que el nivel de expresión de MMP2 se ve afectada por los polimorfismos en la región promotora del gen.

En nuestro estudio encontramos que los pacientes con el genotipo CC presentan mayor supervivencia  $p=0,016$ , estos resultados sugieren que los pacientes con el genotipo CC pueden expresar bajos niveles de MMP2. El impacto de este polimorfismo debe ser explorado.

Una vez revisada la bibliografía, hasta la fecha sólo hay un estudio que valora el papel de los polimorfismos de MMP2 con la respuesta clínica (181), en el que no encuentran diferencias significativas entre el SNP rs12934241 y SLP y SG, sólo observaron que los pacientes homocigotos TT presentaban más riesgo de presentar neutropenia G3-4,  $p=8.8 \times 10^{-5}$ .

## 5. Interacciones gen-gen

Un polimorfismo por sí sólo puede ser que no tenga efectos espectaculares sobre la toxicidad o eficacia, sino que más bien su fenotipo se deba al resultado de la acumulación de múltiples genotipos variantes. Bajo este contexto resulta interesante el estudio de las interacciones entre diferentes genes polimórficos que biológicamente actúen en la misma ruta metabólica, ya sea porque participen, en los mecanismos de reparación o porque sean enzimas del metabolismo o transportadores, de forma sincronizada y complementaria para evitar los daños al ADN.

El análisis de la interacción de múltiples genes dentro de la ruta metabólica del platino puede proporcionar resultados más comprensibles acerca de cómo las variantes polimórficas de estos genes afectan a la eficacia o toxicidad.

Hemos analizado la interacción de polimorfismos y después de examinar todas las combinaciones posibles, hemos encontrado una entre los transportadores y las enzimas de reparación con un efecto significativo sobre la respuesta.

Son escasas las referencias respecto a las interacciones entre genes transportadores y de los mecanismos de reparación, en la literatura hay algún estudio que evalúa el papel de la interacción entre la vía BER y RH y entre genes de reparación y del metabolismo (GSH).

Aunque nuestros resultados con polimorfismos para ATP y genes de reparación son concluyentes para la interacción entre las variantes de estos genes, es necesario hacer estudios con poblaciones mayores ya que nuestro tamaño muestral fue muy pequeño.

Una teoría de estos hallazgos puede ser que los polimorfismos genéticos de ATP7B pueden afectar a la eficacia de la QT basada en platino, cambiando la expresión proteica de ATP7B en los tejidos tumorales. La mutación de rs2147363 y rs1061472 puede disminuir los niveles de expresión de la proteína ATP7B, por lo tanto, reduce el flujo de salida de platino y mantiene la acumulación intracelular de platino para mejorar la sensibilidad del tumor a la quimioterapia.

La literatura muestra controversia en cuanto al papel de ERCC2 Lys751Gln y la respuesta a la QT, en el meta-análisis de Yang y cols. tras evaluar 22 estudios en pacientes con cáncer de pulmón a tratamiento con QT basada en platino, concluyen que no existe una asociación con la respuesta,  $p=0,707$  (141). Por otro lado, la mayoría de los estudios apuntan a que la variante Gln está asociada a baja capacidad de reparación del ADN y que pacientes con baja capacidad de reparación son más susceptibles al daño en el ADN inducido por RDT.

En cuanto a los SNPs en ERCC4 se ha visto que pueden alterar la capacidad de reparación del ADN mediante la modificación de la expresión o función de ERCC4. Por esta razón, han sido evaluados SNPs en ERCC4 por su asociación con el riesgo de cáncer. Hasta la fecha, sólo el estudio de Sullivan ha encontrado una asociación con el SNP rs1799801 de ERCC4 para la respuesta, los pacientes con la variante genotípica TT mostraban menores tasas de respuestas.

Las implicaciones mecánicas de este SNP sigue siendo incompleta. Se podría hipotetizar con que SNPs en ERCC4 podrían correlacionarse con un cambio en la expresión de la proteína, con el nivel de actividad o función, que a su vez podría afectar la respuesta al tratamiento. Sin embargo, ninguno de los SNPs analizados en la literatura se correlacionan con la expresión de la proteína ERCC4.

Experimentos en líneas celulares y en modelos animales demuestran que una baja expresión de ERCC4 se asocia con una exquisita sensibilidad a los agentes que dañan el ADN (182, 183). Del mismo modo, los tumores que expresaban un bajo nivel de ERCC4 fueron más propensos a ser sensibles a agentes genotóxicos tales como el cisplatino y la radiación. En el estudio de Vaezi y cols. encontraron que los tumores con niveles bajos de ERCC4 tienen un mejor resultado clínico, esto es coherente con este mecanismo expuesto antes (184).

Este resultado es interesante en tanto que sugiere una posible interacción entre estos genes y que sus polimorfismos pueden tener efectos sinérgicos sobre la respuesta clínica.

Otra de las interacciones interesante fue la surgida entre ERCC4 y FGFR4. La vía de señalización del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)/receptor del FGF desempeña un papel crucial en multitud de actividades biológicas como la proliferación, diferenciación, angiogénesis, supervivencia y mortalidad en una variedad de tejidos. El papel de FGFR4 en cáncer no ha sido esclarecido, el polimorfismo rs351855 en el exón 9 resultado de un cambio de aminoácido (Gly388Arg) en el dominio transmembrana del receptor, descubierto en línea germinal en 2002, ha sido estudiado en diferentes tipos de cáncer, y encuentran que los portadores del alelo Arg presentan peor pronóstico (185-187). Estos resultados deberían explorarse con mayor profundidad en una serie más larga para descartar que se deba a una asociación espuria.

## 6. Haplotipos

A pesar, de la importancia de los análisis de haplotipos, los datos publicados al respecto son casi inexistentes.

Trabajos recientes sugieren que los haplotipos de ERCC1 también pueden tener un significado funcional. Un estudio in vitro de Zhao y cols. mostraron que un haplotipo específico de ERCC1 se asocia con mayores niveles de aductos de ADN en cultivos de linfocitos de pacientes caucásicos (188). Posteriormente se asoció el haplotipo con menores niveles de mRNA en linfocitos (189).

Pese a que desde el punto de vista biológico ERCC1 sea un candidato ideal para explicar la sensibilidad o resistencia a compuestos de platino, no se pueden extraer conclusiones consistentes con respecto a su valor como biomarcador en clínica.

ERCC1 y ERCC2 juegan un papel crítico en la vía NER que repara el daño del ADN inducido por agentes quimioterapéuticos. Por lo tanto, los SNPs en estos genes podrían tener un impacto en la respuesta clínica en pacientes con CECC que recibieron QT.

Aunque tanto ERCC1 y ERCC2 se encuentran en el cromosoma 19 y participan en la actividad de NER, son pocos los estudios que han investigado simultáneamente los efectos de las variantes en ERCC1 y ERCC2 y la respuesta clínica. La mayoría de los resultados evalúan la asociación de estos genes con la respuesta de forma individual.

En nuestra serie de pacientes, se encontró una asociación significativa con el haplotipo TGA, compuesto por la variante genotípica de los SNPs rs238406T, rs735482G y rs3212986A, y la tasa de respuestas. Estas variantes se correlacionaron con una mejor tasa de respuestas, lo que sugiere la sensibilidad del tumor al régimen de QRDT, por tanto, los pacientes con las variantes TGA pueden tener un pronóstico favorable.

La mayoría de los estudios publicados se centran en la susceptibilidad a desarrollar cáncer, y encuentran que los genotipos y los haplotipos de rs3212986 y rs238406 modulan la eficacia del sistema de reparación del ADN y que las variantes alélicas de estos SNPs se asocian con una capacidad reducida de la reparación del ADN en respuesta a agentes carcinógenos medioambientales como puede ser el tabaco. Actualmente se ha publicado un estudio en pacientes con cáncer gástrico que evalúan los efectos individuales y conjuntos de estos SNPs ERCC1 rs3213986, ERCC2 rs13181 y rs1799793 con la respuesta clínica, en términos de supervivencia. Concluyen que los pacientes con el haplotipo AGG, compuesto por los SNPs rs1799793A, rs13181G y rs3213986G presentan una pobre supervivencia en comparación con el haplotipo salvaje GTG (190).

Por otro lado, en cuanto a la toxicidad, podemos observar que el efecto acumulativo del haplotipo AGT, compuesto por la variante común de los rs735482A, rs3212986G y rs11615T, puede ser el resultado de la sinérgica de cada SNP. Nosotros encontramos que los SNPs de ERCC1 (rs rs735482 y rs11615) de forma independiente y conjuntamente (rs735482,

rs3212986 y rs11615) afectan a la toxicidad hematológica de los pacientes de CECC tratados con QRDT.

Son varios los estudios que analizan si estos SNPs de ERCC1 de forma individual pueden afectar a la toxicidad durante el tratamiento con QT basada en platino como se puede ver en la siguiente tabla 31. Sin embargo, en ninguno de ellos encuentran una asociación estadísticamente significativa.

**Tabla 31: Relación de SNPs de ERCC1 y toxicidad en pacientes a tratamiento con platino (137)**

SNPs	Study	First author, year	Case no.	Toxicity
ERCC1 C118T	10	Isla, 2004	62	Grade 2–4, NS
		Chen, 2010	95	≥1 grade, NS
		Gandara, 2009	381	Grade 3–4, neutropenia (TT vs TC/CC: HR=0.57, 95 % CI=0.20–1.61, $p=0.35$ )
		Kalikak, 2009	119	≥3 grade, NS
		Ludovini, 2011	192	Grades 3–4, hematologic (CT vs CC: OR=0.92, 95 % CI=0.35–2.39, $p=0.86$ ; TT vs CC: OR=2.47, 95 % CI=0.79–7.72, $p=0.12$ )
		Tibaldi, 2008	65	Graded 3–4, neutropenia ( $p=0.31$ ), thrombocytopenia ( $p=0.72$ ), anemia ( $p=0.35$ ), nonhematologic ( $p=0.35$ )
		Vinolas, 2011	94	Grades 3–4, NS
		Suk, 2004	214	Grades 3–4, TC + TT vs CC, hematologic (OR=1.08, 95 % CI=0.59–1.98, $p=0.8$ ); gastrointestinal (OR=1.47, 95 % CI=0.66–3.28, $p=0.35$ )
		Iranzo, 2011	493	Grades 1–4, neutropenia ( $p=0.53$ )
		Joerger, 2012	137	Severe toxicity, NS
ERCC1 C8092A	4	Kalikak, 2009	119	≥3 grade, NS
		KimCurran, 2011	300	Grades 1–3, NS
		Suk, 2004	214	Grades 3–4, AC + AA vs CC, hematologic (OR=1.06, 95 % CI=0.59–1.91, $p=0.84$ ); gastrointestinal (OR=2.33, 95 % CI=1.07–5.05, $p=0.03$ )
		Iranzo, 2011	493	Grades 1–4, neutropenia ( $p=0.92$ )

Como en el caso de la mayoría de las asociaciones genéticas descritas hasta el momento, los mecanismos moleculares subyacentes a estos resultados aún no se han estudiado. Esto implica que se necesitan estudios adicionales para clarificar si los SNPs aquí estudiados están directamente involucrados con la presencia de toxicidad hematológica.

Este estudio prospectivo fue diseñado como un enfoque basado en el estudio de genes candidatos que previamente habían sido identificados como marcadores predictivos o pronósticos en cuanto a la toxicidad o eficacia al tratamiento con cisplatino y radioterapia. El valor individual de los SNPs asociados a la toxicidad o eficacia para desarrollar modelos predictivos actualmente es muy limitado, además nos encontramos con el inconveniente de

que muchas de las asociaciones identificadas en la literatura pueden ser debidas al azar, debido a que la mayoría de los estudios no realizan correcciones para comparaciones múltiples mediante el test de Bonferroni para controlar la multiplicidad y el riesgo de identificar incorrectamente asociaciones. Con todo aún estamos lejos de comprender la arquitectura genética completa de esta enfermedad.







## **CAPÍTULO VII**

### **CONCLUSIONES**



En relación a la evaluación de las variantes genéticas en la ruta metabólica del platino como marcadores farmacogenéticos de toxicidad y/o respuesta en cáncer localmente avanzado de cabeza y cuello tratados con radioquimioterapia concomitante, las conclusiones son las siguientes:

- Hay una escasez de marcadores predictivos en el CECC que se puedan utilizar para guiar las decisiones clínicas en estos pacientes. Nuestros resultados confirman algunos previamente descritos pero también identificamos nuevos genes candidatos que pueden ser considerados en conjunción con factores pronósticos conocidos para ayudar a optimizar las decisiones terapéuticas con la intención de maximizar el beneficio y minimizar las toxicidades.
- El número de pacientes en el estudio fue relativamente bajo y ninguno de los SNPs analizados individualmente superó la corrección de Bonferroni, lo que no nos permite sacar conclusiones firmes. Sin embargo, nuestros resultados ilustran la complejidad de los mecanismos de reparación del ADN e indican que múltiples genes pueden desempeñar un papel como biomarcadores.
- Varios SNPs individuales en genes transportadores (ABCB1, ABCC1 y ATP7B) sugieren asociación con toxicidad hematológica, una de las causas de esta toxicidad puede ser debida a la acumulación intracelular de cisplatino.
- Ninguno de los genes involucrados en la vía de reparación BER mostró una asociación con la toxicidad o eficacia.
- Los portadores del alelo G del polimorfismo GSTP1 A316G apuntan a un efecto protector para la presencia de disfagia.
- Varios polimorfismos en ERCC2 sugieren ser buenos predictores de respuesta al tratamiento con QRDT.
- La interacción entre genes ha proporcionado una información más completa que la derivada del análisis individualizado de los polimorfismos para la respuesta al tratamiento. El carácter predictivo deberá ser confirmado en poblaciones más amplias.
- El haplotipo AGT formado por los SNPs rs735482, rs3212986, rs11615, confiere

riesgo para toxicidad hematológica.

- El haplotipo TGA formado por los SNPs rs238406, rs735482 y rs3212986 tiene un efecto protector para la tasa de respuestas.
- El genotipo GG del polimorfismo rs12934241 en MMP2 se asocia a una mayor supervivencia al igual que el genotipo GG del polimorfismo ABCC2 -24C>T.
- La inclusión de los estudios farmacogenéticos en los ensayos de cáncer de cabeza y cuello podrían ayudar a personalizar el tratamiento y optimizar la evolución del paciente.





## **CAPÍTULO VIII**

### **ANEXOS**



**American Joint Committee on Cancer (AJCC) Tumor Staging by Site**

**A. Oral Cavity**

**PRIMARY TUMOR (T)**

TX Primary tumor cannot be assessed

T0 No evidence of primary tumor

Tis Carcinoma in situ

T1 Tumor 2 cm or less in greatest dimension

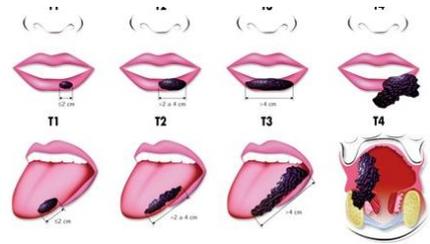
T2 Tumor more than 2 cm but not greater than 4 cm in greatest dimension

T3 Tumor more than 4 cm in greatest dimension

T4a Moderately advanced local disease\* Tumor invades through cortical bone, inferior alveolar nerve, floor of mouth, or skin of face—that is, chin or nose (oral cavity). Tumor invades adjacent structures (e.g., through cortical bone, into deep (extrinsic) muscle of tongue (genioglossus, hypoglossus, palatoglossus, and styloglossus), maxillary sinus, skin of face)

T4b Very advanced local disease. Tumor invades masticator space, pterygoid plates, or skull base and/or encases internal carotid artery

\*Note: Superficial erosion alone of bone/tooth socket by gingival primary is not sufficient to classify as T4.



**B. Oropharynx**

**PRIMARY TUMOR (T)**

TX Primary tumor cannot be assessed

T0 No evidence of primary tumor

Tis Carcinoma in situ

T1 Tumor 2 cm or less in greatest dimension

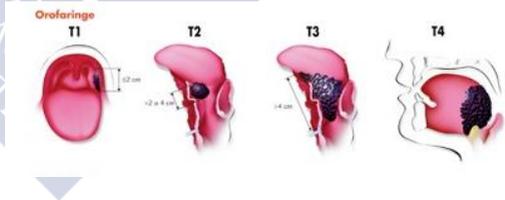
T2 Tumor more than 2 cm but not more than 4 cm in greatest dimension

T3 Tumor more than 4 cm in greatest dimension or extension to lingual surface of epiglottis

T4a Moderately advanced local disease. Tumor invades the larynx, deep/extrinsic muscle of the tongue, medial pterygoid, hard palate, or mandible\*

T4b Very advanced local disease. Tumor invades the lateral pterygoid muscle, pterygoid plates, lateral

nasopharynx, or skull base, or encases the carotid artery



\*Note: Mucosal extension to lingual surface of epiglottis from primary tumors of the base of the tongue and vallecula does not constitute invasion of larynx.

### C. Larynx

#### PRIMARY TUMOR (T)

TX Primary tumor cannot be assessed

T0 No evidence of primary tumor

Tis Carcinoma in situ

#### C1. Supraglottis

T1 Tumor limited to one subsite of the supraglottis with normal vocal fold mobility

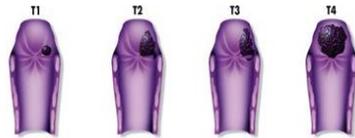
T2 Tumor invades mucosa of more than one adjacent subsite of the supraglottis or glottis or

region outside the supraglottis (e.g., mucosa of base of tongue, vallecula, medial wall of pyriform sinus) without fixation of the larynx

T3 Tumor limited to the larynx with vocal fold fixation and/or invades any of the following: postcricoid area, pre-epiglottic tissues, paraglottic space, and/or inner cortex of thyroid cartilage

T4a Moderately advanced local disease. Tumor invades through the thyroid cartilage and/or invades tissues beyond the larynx (e.g., trachea, soft tissues of neck including deep extrinsic muscle of the tongue, strap muscles, thyroid, or esophagus)

T4b Very advanced local disease. Tumor invades prevertebral space, encases carotid artery, or invades mediastinal structures

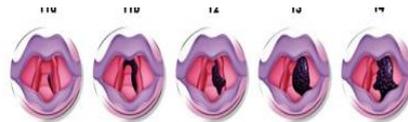


#### C2. Glottis

T1 Tumor limited to the vocal fold(s) (may involve anterior or posterior commissure) with normal mobility

T1a Tumor limited to one vocal fold

T1b Tumor involves both vocal folds



T2 Tumor extends to the supraglottis and/or subglottis, and/or with impaired vocal fold mobility

T3 Tumor limited to the larynx with vocal fold fixation and/or invasion of paraglottic space, and/or inner cortex of the thyroid cartilage

T4a Moderately advanced local disease. Tumor invades the outer cortex of the thyroid cartilage and/or invades tissues beyond the larynx (e.g., trachea, soft tissues of the neck, including deep extrinsic muscle of the tongue, strap muscles, thyroid, or esophagus)

T4b Very advanced local disease. Tumor invades prevertebral space, encases carotid artery, or invades mediastinal structures

### C3. Subglottis

T1 Tumor limited to the subglottis

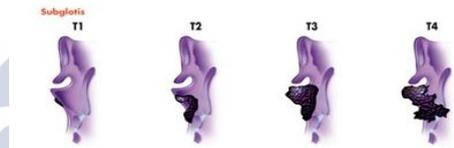
T2 Tumor extends to the vocal cord(s) with normal or impaired mobility.

T3 Tumor limited to the larynx with vocal fold fixation.

T4a Moderately advanced local disease. Tumor invades cricoid or thyroid cartilage and/or invades tissues

beyond the larynx (e.g., trachea, soft tissues of the neck including deep extrinsic muscles of the tongue, strap muscles, thyroid, or esophagus)

T4b Very advanced local disease. Tumor invades prevertebral space, encases carotid artery, or invades mediastinal structures



### D. Hypopharynx

#### PRIMARY TUMOR (T)

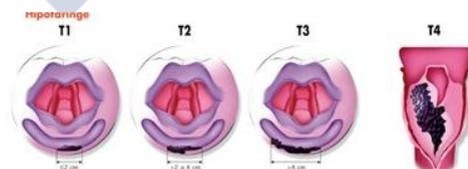
TX Primary tumor cannot be assessed

T0 No evidence of primary tumor

Tis Carcinoma in situ

T1 Tumor limited to one subsite of the hypopharynx and is 2 cm or less in greatest dimension

T2 Tumor invades more than one subsite of the hypopharynx or an adjacent site, or measures more than 2 cm but not more than 4 cm in greatest dimension without fixation of the hemilarynx or extension to the esophagus



T3 Tumor more than 4 cm in greatest dimension or with fixation of the hemilarynx or extension to the esophagus

T4a Moderately advanced local disease. Tumor invades thyroid/cricoid cartilage, hyoid bone, thyroid gland, esophagus, or central compartment soft tissue\*

T4b Very advanced local disease. Tumor invades prevertebral fascia, encases carotid artery, or involves mediastinal structures

\*Note: Central compartment soft tissue includes prelaryngeal strap muscles and subcutaneous fat.

### E. Nasal Cavity and Paranasal Sinuses

#### PRIMARY TUMOR (T)

TX Primary tumor cannot be assessed

T0 No evidence of primary tumor

Tis Carcinoma in situ

#### E.1 Maxillary Sinus

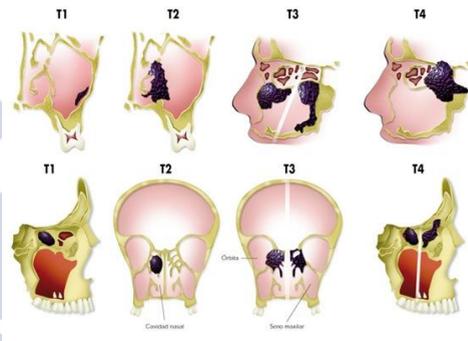
T1 Tumor limited to the maxillary sinus mucosa with no erosion or destruction of bone

T2 Tumor causing bone erosion or destruction, including extension into the hard palate and/or middle nasal meatus, except extension to the posterior wall of the maxillary sinus and pterygoid plates

T3 Tumor invades any of the following: bone of the posterior wall of the maxillary sinus, subcutaneous tissues, floor or medial wall of the orbit, pterygoid fossa, or ethmoid sinuses

T4a Moderately advanced local disease. Tumor invades anterior orbital contents, skin of cheek, pterygoid plates, infratemporal fossa, cribriform plate, sphenoid or frontal sinuses

T4b Moderately advanced local disease. Tumor invades any of the following: orbital apex, dura, brain, middle cranial fossa, cranial nerves other than maxillary division of trigeminal nerve (V2), nasopharynx, or clivus



#### E.1 Nasal Cavity and Ethmoid Sinus

T1 Tumor restricted to any one subsite, with or without bony invasion

T2 Tumor invades two subsites in a single region or extending to involve an adjacent region within the nasoethmoidal complex, with or without bony invasion

T3 Tumor extends to invade the medial wall or floor of the orbit, maxillary sinus, palate, or cribriform plate

T4a Moderately advanced local disease. Tumor invades any of the following: anterior orbital contents, skin of nose or cheek, minimal extension to anterior cranial fossa, pterygoid plates, sphenoid or frontal sinuses

T4b Very advanced local disease. Tumor invades any of the following: orbital apex, dura, brain, middle cranial fossa, cranial nerves other than V2, nasopharynx, or clivus

## F. Salivary Glands

### PRIMARY TUMOR (T)

TX Primary tumor cannot be assessed

T0 No evidence of primary tumor

T1 Tumor 2 cm or less in greatest dimension without extraparenchymal extension

T2 Tumor greater than 2 cm but not more than 4 cm in greatest dimension without extraparenchymal extension\*

T3 Tumor more than 4 cm and/or tumor having extraparenchymal extension

T4a Moderately advanced local disease. Tumor invades the skin, mandible, ear canal, and/or facial nerve

T4b Very advanced local disease. Tumor invades the skull base and/or pterygoid plates and/or encases the carotid artery

\*Note: Extraparenchymal extension is a clinical macroscopic evidence of invasion of soft tissues. Microscopic evidence alone does not constitute extraparenchymal extension for classification purposes.

### REGIONAL LYMPH NODES (N):

This staging system excludes the nasopharynx and thyroid.

NX Regional lymph nodes cannot be assessed

N0 No regional nodes metastasis

N1\* Metastasis in a single ipsilateral lymph node, 3 cm or less in greatest dimension

N2\* Metastasis in a single ipsilateral lymph node, more than 3 cm but not more than 6 cm in greatest dimension; or in multiple ipsilateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest

dimension; or in bilateral or contralateral lymph nodes, none greater than 6 cm in greatest dimension

N2a\* Metastasis in a single ipsilateral lymph node, more than 3 cm but not more than 6 cm in greatest dimension

N2b\* Metastasis in multiple ipsilateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension

N2c\* Metastasis in bilateral or contralateral lymph nodes, none more than 6 cm in greatest dimension

N3\* Metastasis in a lymph node more than 6 cm in greatest dimension.

\*Note: A designation of “U” or “L” may be used for any N stage to indicate metastasis above the lower border of the cricoid cartilage (U) or below the lower border of the cricoid cartilage (L). Similarly, clinical/radiological ECS should be recorded as E– or E+.

### G. Nasopharynx

#### PRIMARY TUMOR (T)

TX Primary tumor cannot be assessed

T0 No evidence of primary tumor

Tis Carcinoma in situ

T1 Tumor confined to the nasopharynx

or tumor extends to the oropharynx and/or nasal cavity without parapharyngeal extension

T2 Tumor with parapharyngeal extension

T3 Tumor involves bony structures of skull base and/or paranasal sinuses

T4 Tumor with intracranial extension and/or involvement of cranial nerves, hypopharynx, orbit, or with extension to the infratemporal fossa/ masticator space



#### REGIONAL LYMPH NODES (N):

This staging system for nasopharynx. This site is different from other head and neck sites.

NX Regional lymph nodes cannot be assessed

N0 No regional lymph node metastasis

N1 Unilateral metastasis in cervical lymph node(s), 6 cm or less in greatest dimension, above the supraclavicular fossa, and/or unilateral or bilateral retropharyngeal lymph nodes, 6 cm or less in greatest dimension\*

N2 Bilateral metastasis in cervical lymph node(s), 6 cm or less in greatest dimension, above the supraclavicular fossa\*

N3 Metastasis in lymph node)\* >6 cm and/or to supraclavicular fossa\*

N3a Greater than 6 cm in dimension

N3b Extension to the supraclavicular fossa\*\*

\*Note: Midline nodes are considered ipsilateral nodes.

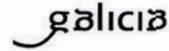
\*\*Note: Supraclavicular zones or fossa is relevant to the staging of nasopharyngeal carcinoma and is the triangular region originally described by Ho. It is defined by three points: (1) the superior margin of the sternal end of the clavicle, (2) the superior margin of the lateral end of the clavicle, (3) the point where the neck meets the shoulder. Note that this would include caudal portions of Levels IV and VB. All cases with lymph nodes (whole or part) in the fossa are considered N3b.

Agrupación por estadios del AJCC. Laringe, orofaringe, hipofaringe, cavidad oral, glándulas salivares y senos paranasales	
Estadio 0	Tis, N0, M0
Estadio I	T1, N0, M0
Estadio II	T2, N0, M0
Estadio III	T3, N0, M0 T1, N1, M0 T2, N1, M0 T3, N1, M0
Estadio IVA	T4a, N0, M0 T4a, N1, M0 T1, N2, M0 T2, N2, M0 T3, N2, M0 T4a, N2, M0
Estadio IVB	Cualquier T, N3, M0 T4b, cualquier N, M0
Estadio IVC	Cualquier T, cualquier N, M1

Agrupación por estadios del AJCC. Nasofaringe	
Estadio 0	Tis, N0, M0
Estadio I	T1, N0, M0
Estadio II	T2, N0, M0
Estadio III	T1, N2, M0 T2, N2, M0 T3, N0, M0 T3, N1, M0 T3, N2, M0
Estadio IVA	T4, N0, M0 T4, N1, M0 T4, N2, M0
Estadio IVB	Cualquier T, N3, M0
Estadio IVC	Cualquier T, cualquier N, M1



Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia  
 Edificio Administrativo de San Lázaro  
 15781 SANTIAGO DE COMPOSTELA  
 Tlf: 881 546425 Fax: 881 541904  
 ceic@sergas.es



## DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE GALICIA

Paula M. López Vázquez, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia

### CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 30/04/2013 el estudio:

**Título:** Búsqueda de biomarcadores farmacogenéticos predictivos de toxicidad y eficacia del tratamiento de cisplatino-radioterapia en pacientes con cáncer de cabeza y cuello y valoración de su utilidad clínica

**Promotor:** Maria Jesús Lamas Diaz

**Tipo de estudio:** EPA-OD

**Código de Registro CEIC de Galicia:** 2012/218

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, y la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos de la Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del CEIC de Galicia

Emite un **INFORME FAVORABLE** para la realización del estudio en los centros y con los investigadores siguientes

Centros	Investigadores Principales
C.H. Universitario de Santiago	Maria Jesús Lamas Diaz

En Santiago de Compostela, a 08 de mayo de 2013  
 La Secretaria



Paula M. López Vázquez

NOMBRE DEL ESTUDIO:

#### INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES FARMACOGENÉTICOS PREDICTIVOS DE TOXICIDAD Y EFICACIA DEL TRATAMIENTO DE CISPLATINO-RADIOTERAPIA EN PACIENTES CON CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO Y VALORACIÓN DE SU UTILIDAD CLÍNICA.

##### 1. Objetivo

Este documento tiene por objeto pedirle su consentimiento para ser incluido en un estudio encaminado a analizar algunas alteraciones genéticas que pueden estar en relación con la aparición de ciertos efectos secundarios a la quimioterapia en pacientes de cabeza y cuello.

Existe una gran heterogeneidad en la respuesta individual a la quimioterapia, no sólo en términos de eficacia sino también de toxicidad, pudiendo esta última llegar a comprometer la vida del paciente. El objetivo de los estudios farmacogenéticos es identificar las bases hereditarias de las diferencias en la respuesta interindividual a fármacos, con el fin último de seleccionar el tratamiento óptimo en función del perfil genético de cada paciente.

El único procedimiento que se le realizará además del establecido de forma estándar será la extracción de 1 muestra de sangre de 5 mililitros, como la que se realiza en un análisis de sangre rutinario. El ADN obtenido será almacenado y conservado a bajas temperaturas, en un lugar seguro y de acceso restringido durante el cual podrá ser analizado para valorar la presencia de alteraciones genéticas que afecten a la respuesta a los medicamentos usados en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello y sólo para ese fin.

##### 2. Descripción de los procedimientos del estudio

Para este estudio se le extraerá una muestra de sangre o fluidos biológicos para analizar posibles cambios genéticos que influyan en la respuesta a fármacos. Se revisarán y recogerán datos de la historia clínica relacionados con su enfermedad.

##### 3. Beneficios

Usted no obtendrá ningún beneficio inmediato de la participación en este estudio. Sin embargo, la información obtenida en este estudio puede permitir conocer las asociaciones existentes entre alteraciones genéticas y respuesta a quimioterapia incluyendo posibles efectos secundarios. Los datos obtenidos nos permitirán desarrollar estrategias de prevención de efectos secundarios y optimizar la respuesta a tratamientos quimioterápicos.

##### 4. Riesgos

Su participación en este estudio no supondrá ningún riesgo adicional, puesto que no implica ningún cambio en las medidas de diagnóstico y tratamiento que se le van a aplicar.

5. Participación voluntaria

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Usted es libre de retirarse del estudio en cualquier momento si así lo cree conveniente, sin tener que especificar los motivos, y sin que su decisión perjudique en el futuro la atención médica que merece. Puede ejercer su derecho a solicitar la destrucción de las muestras donadas en cualquier momento dirigiéndose a la Responsable de este Estudio.

6. Confidencialidad

Toda la información resultante de su participación en el Estudio será almacenada, sus datos serán tratados de forma codificada para garantizar el anonimato de su identidad y se tratarán de forma confidencial conforme al REAL DECRETO 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. Usted tendrá derecho a conocer los resultados relacionados con los procedimientos realizados en el contexto del estudio con la advertencia de que pueden tener difícil interpretación clínica. Los resultados del Estudio pueden ser publicados en revistas médicas. Sin embargo, su nombre no aparecerá en ningún documento. Este Estudio ha sido aprobado por el Comité Ético.

7. Información

El Responsable del Estudio en este Centro, María Jesús Lamas, es facultativo de plantilla de este Hospital y le dará toda la información complementaria del estudio que Usted desee. Usted puede contactar con este facultativo llamando al teléfono 981 951469

Las muestras obtenidas serán codificadas, se almacenarán en este Hospital y no serán utilizadas para ninguna finalidad empresarial o que pueda implicar la obtención de beneficios económicos. Una vez realizado el estudio las muestras serán destruidas. No se utilizarán para otros análisis genéticos que no sean la respuesta a fármacos en el tratamiento de su enfermedad de cabeza y cuello. Sus muestras y datos asociados serán guardados de forma anónima conforme al Real Decreto 1716/2011.

8. ¿Qué otras opciones tiene Usted?

Usted puede decidir no participar en este estudio.

Facultativo que participa en la obtención del consentimiento:

.....

CONSENTIMIENTO INFORMADO

NOMBRE DEL ESTUDIO:

BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES FARMACOGÉNÉTICOS PREDICTIVOS DE TOXICIDAD Y EFICACIA DEL TRATAMIENTO DE CISPLATINO-RADIOTERAPIA EN PACIENTES CON CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO Y VALORACIÓN DE SU UTILIDAD CLÍNICA.

Código del Estudio:

Yo,

(nombre y apellidos en mayúsculas)

.....

- He leído la hoja de información que se me ha entregado

- He podido hacer preguntas sobre el Estudio

- He recibido suficiente información sobre el Estudio

- He hablado con:

(nombre del investigador en mayúsculas)

.....

Comprendo que:

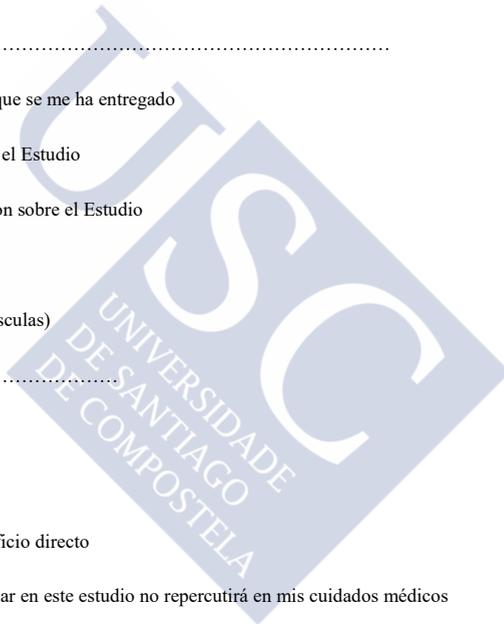
1. Mi participación es voluntaria
2. Que no me supone ningún beneficio directo
3. Que la no aceptación de participar en este estudio no repercutirá en mis cuidados médicos
4. Que la información obtenida de este estudio es confidencial

Doy mi autorización para que se utilice para este estudio:

\_\_ mi historia clínica

\_\_ muestra sanguínea o fluido biológico

(Fecha) (Firma del participante)



CONSENTIMIENTO ORAL ANTE TESTIGOS

NOMBRE DEL ESTUDIO:

BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES FARMACOGENÉTICOS PREDICTIVOS DE TOXICIDAD Y EFICACIA DEL TRATAMIENTO DE CISPLATINO-RADIOTERAPIA EN PACIENTES CON CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO Y VALORACIÓN DE SU UTILIDAD CLÍNICA.

Código del Estudio:

Yo,

(nombre y apellidos en mayúsculas)

.....

- He leído la hoja de información que se me ha entregado

- He podido hacer preguntas sobre el Estudio

- He recibido suficiente información sobre el Estudio

- He hablado con:

(nombre del investigador en mayúsculas)

.....

Comprendo que:

1. Mi participación es voluntaria
2. Que no me supone ningún beneficio directo
3. Que la no aceptación de participar en este estudio no repercutirá en mis cuidados médicos
4. Que la información obtenida de este estudio es confidencial

Doy mi autorización para que se utilice para este estudio:

\_\_ mi historia clínica

\_\_ muestra sanguínea o fluido biológico

(Fecha) (Firma del TESTIGO)

## LISTADO DE INICIADORES UTILIZADOS EN LA REACCIÓN iPLEX

WE LL	SNP_ID	2nd-PCR	1st-PCR	Tm( NN)
W1	rs1800925	ACGTTGGATGAGCCATGTGCGCTTTT CCTG	ACGTTGGATGCAACACCCAACAGGCAA ATG	46.7
W1	rs1799793	ACGTTGGATGGGAGGCGGAAAGGG ACTG	ACGTTGGATGACGGACGCCACCTGGC CAA	49.3
W1	rs735482	ACGTTGGATGTCCTGCTTCACTGTCT TGTC	ACGTTGGATGTTCCCGTCCACCACCAA GAA	45.2
W1	rs25487	ACGTTGGATGATCGTGCCTAAGGAG TGGGT	ACGTTGGATGCAGGATAAGGAGCAGGG TTG	62.0
W1	rs1801320	ACGTTGGATGCAAGCGAGTAGAGAA GTGGA	ACGTTGGATGCCCCGCGCTCCGACTTC AC	48.6
W1	rs2228001	ACGTTGGATGAGAAAGCAGCAGCTT CCCAC	ACGTTGGATGAACTGGTGGGTGCCCT CTA	46.6
W1	rs2147363	ACGTTGGATGTCATGGCTGTAACACT CTGG	ACGTTGGATGGAGGATTCTGGGAAGAT GTG	54.4
W1	rs1799801	ACGTTGGATGAAGCAAGCCACAGCC TGATG	ACGTTGGATGTTATACTTCTCTGACTCG GG	48.4
W1	rs11615	ACGTTGGATGATAGTCGGGAATTAC GTCGC	ACGTTGGATGGGCAATCCCGTACTGAA GTT	46.2
W1	rs2074549	ACGTTGGATGCTTCCCTGTCCAGA AATC	ACGTTGGATGACAGTGTCTTAGGCAG TTG	45.1
W1	rs2072671	ACGTTGGATGCTGAAGCCTGAGTGTG TCCA	ACGTTGGATGACAGGAAAAGTACTGTA GGG	50.6
W1	rs1695	ACGTTGGATGTGGTGGACATGGTGA ATGAC	ACGTTGGATGTGGTGCAGATGCTCACA TAG	47.6
W1	rs2032582	ACGTTGGATGCATATTTAGTTTACT CACC	ACGTTGGATGTGTTGTCTGGACAAGCA CTG	47.6
W1	rs2231142	ACGTTGGATGGTCATAGTTGTTGCAA GCCG	ACGTTGGATGTGATGTTGTGATGGGCA CTC	47.2
W1	rs4880	ACGTTGGATGTTCTGCCTGGAGCCCA GATA	ACGTTGGATGTGCTTTCTCGTCTTCAGC AC	48.6
W1	rs17655	ACGTTGGATGTCGCAGCTGTTCTCC TTTG	ACGTTGGATGACCTGCCTCTCAGAATC ATC	46.1
W1	rs2267437	ACGTTGGATGAGTCGTGGCCCAAGTC TCC	ACGTTGGATGCATCATGCTGGGTGAGG G	59.2
W1	rs13181	ACGTTGGATGCACCAGGAACCGTTTA TGCC	ACGTTGGATGAGCAGCTAGAATCAGAG GAG	51.6
W1	rs1801244	ACGTTGGATGGCAAACCTACAGATGG TACAC	ACGTTGGATGGGACTTTGCCAAGATGT CCG	45.3

## LISTADO DE INICIADORES UTILIZADOS EN LA REACCIÓN iPLEX

W1	rs1800469	ACGTTGGATGAAGAGGGTCTGTCAA CATGG	ACGTTGGATGTACAGGTGTCTGCCTCCT GA	55.0
W1	rs2248718	ACGTTGGATGGCAAAAAAGCAAGTG ACAGG	ACGTTGGATGTACATCTCTGTCTCACAC AC	48.9
W1	rs238406	ACGTTGGATGTCAGCCCTGCCCTCCA GTAA	ACGTTGGATGCAGTACCAGCATGACAC CAG	53.9
W1	rs2853826	ACGTTGGATGTCTGGCCTATGAGTGA CTAC	ACGTTGGATGGAGTCGAAATCATTTCGT TTTG	49.9
W1	rs2242047	ACGTTGGATGTTGTGGCCTATCAAGA CCTC	ACGTTGGATGTCACGGAGATCCACTGC TTC	52.5
W1	rs12934241	ACGTTGGATGCCTTGACACACTTAAT AGTC	ACGTTGGATGGGGCTTTCAATCTGCAG AAT	47.9
W2	rs1061472	ACGTTGGATGCATCCACTGGAAACTT TCCC	ACGTTGGATGTAAGTGGCGTTTGTTC AGG	54.6
W2	rs351855	ACGTTGGATGTGGAGCGCTGCCCTC GAT	ACGTTGGATGGACATCATCTGTACGC GTC	48.8
W2	rs717620	ACGTTGGATGAGCATGATTCTGGAC TGCG	ACGTTGGATGCCTGTTCCACTTTCTTTG ATG	46.4
W2	rs3212986	ACGTTGGATGCACAGCCGGGACAA GAAG	ACGTTGGATGTTTAGTTTCTCAGTTCC CG	47.1
W2	rs861539	ACGTTGGATGGAAGGCACTGCTCAG CTCA	ACGTTGGATGGCTGTGAATTTGACAGC CAG	50.1
W2	rs246221	ACGTTGGATGACCTTGGAACTCTCTT TCGG	ACGTTGGATGACAACGGCTTCACCTCC TTG	45.2
W2	rs45511401	ACGTTGGATGTGTGTCGTTTCAGCAT CACC	ACGTTGGATGTGAGAGCAGGGACGACT TTC	46.8
W2	rs6464268	ACGTTGGATGAAGTGAACGTGGAG GATGC	ACGTTGGATGAAGGCCTAACTGTGCTT TTC	48.4
W2	rs132788	ACGTTGGATGAAGTGCTTGGTGAGG GCTTC	ACGTTGGATGAAGTTCACTGTGCCCAT GCT	53.6
W2	rs12806698	ACGTTGGATGAATGACGTTACTCGAC GCTG	ACGTTGGATGACTCAACATGGCGGCTA CAC	61.2
W2	rs1045642	ACGTTGGATGGCTGAGAACATTGCCT ATGG	ACGTTGGATGAAGGCATGTATGTTGGC CTC	45.5
W2	rs1800566	ACGTTGGATGTGTGCCCAATGCTATA TGTC	ACGTTGGATGTTCTGTATCCTCAGAGTG GC	46.6
W2	rs689466	ACGTTGGATGTGGAACATAGTTGGAT GAGG	ACGTTGGATGAGCACTACCCATGATAG ATG	50.6
W3	rs1801249	ACGTTGGATGCCACAGCCTCTTTGA ATAG	ACGTTGGATGACTCACGGTTTCCAATC AGC	46.4



## **CAPÍTULO IX**

### **REFERENCIAS**



1. Ferlay J SI, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancerbase N°11. Lyon France. International Agency for Research on Cancer. 2013.
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108.
3. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, et al. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE--5-a population-based study. *Lancet Oncol.* 2014;15(1):23-34.
4. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(9):709-20.
5. Raitiola HS, Pukander JS. Etiological factors of laryngeal cancer. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1997;529:215-7.
6. Maier H, Dietz A, Gewelke U, Heller WD, Weidauer H. Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. *Clin Investig.* 1992;70(3-4):320-7.
7. Riedel F, Goessler UR, Hormann K. Alcohol-related diseases of the mouth and throat. *Dig Dis.* 2005;23(3-4):195-203.
8. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(10):777-89.
9. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001;411(6835):366-74.
10. 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):3282-7.
11. Proia NK, Paszkiewicz GM, Nasca MA, Franke GE, Pauly JL. Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cell mutations and their association with oral cancer--a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(6):1061-77.
12. Warnakulasuriya S. Areca nut use following migration and its consequences. *Addict Biol.* 2002;7(1):127-32.
13. Tota JE, Chevarie-Davis M, Richardson LA, Devries M, Franco EL. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies. *Prev Med.* 2011;53 Suppl 1:S12-21.
14. Campisi G, Giovannelli L, Arico P, Lama A, Di Liberto C, Ammatuna P, et al. HPV DNA in clinically different variants of oral leukoplakia and lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;98(6):705-11.
15. Slebos RJ, Yi Y, Ely K, Carter J, Evjen A, Zhang X, et al. Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006;12(3 Pt 1):701-9.

16. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2007;356(19):1944-56.
17. Pavia M, Pileggi C, Nobile CG, Angelillo IF. Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(5):1126-34.
18. Trizna Z, Schantz SP. Hereditary and environmental factors associated with risk and progression of head and neck cancer. *Otolaryngol Clin North Am*. 1992;25(5):1089-103.
19. Sale KA, Wallace DI, Girod DA, Tsue TT. Radiation-induced malignancy of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004;131(5):643-5.
20. Brennan M, Migliorati CA, Lockhart PB, Wray D, Al-Hashimi I, Axell T, et al. Management of oral epithelial dysplasia: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103 Suppl:S19 e1-2.
21. Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN, Mao L, Lotan R, Shin DM, et al. Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research. *Clin Cancer Res*. 2000;6(5):1702-10.
22. Perez-Ordóñez B, Beauchemin M, Jordan RC. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol*. 2006;59(5):445-53.
23. McCaul JA, Gordon KE, Clark LJ, Parkinson EK. Telomerase inhibition and the future management of head-and-neck cancer. *Lancet Oncol*. 2002;3(5):280-8.
24. Sardi I, Franchi A, De Campora L, Passali GC, Gallo O. Microsatellite instability as an indicator of malignant progression in laryngeal premalignancy. *Head Neck*. 2006;28(8):730-9.
25. Udayakumar T, Shareef MM, Diaz DA, Ahmed MM, Pollack A. The E2F1/Rb and p53/MDM2 pathways in DNA repair and apoptosis: understanding the crosstalk to develop novel strategies for prostate cancer radiotherapy. *Semin Radiat Oncol*. 2010;20(4):258-66.
26. Meredith SD, Levine PA, Burns JA, Gaffey MJ, Boyd JC, Weiss LM, et al. Chromosome 11q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. Association with poor prognosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995;121(7):790-4.
27. Okami K, Reed AL, Cairns P, Koch WM, Westra WH, Wehage S, et al. Cyclin D1 amplification is independent of p16 inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*. 1999;18(23):3541-5.
28. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953;6(5):963-8.
29. Griffioen GH, Louie AV, de Bree R, Smit EF, Paul MA, Slotman BJ, et al. Second primary lung cancers following a diagnosis of primary head and neck cancer. *Lung Cancer*. 2015;88(1):94-9.

30. Partridge M, Pateromichelakis S, Phillips E, Emilion G, Langdon J. Profiling clonality and progression in multiple premalignant and malignant oral lesions identifies a subgroup of cases with a distinct presentation of squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2001;7(7):1860-6.
31. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(1):9-22.
32. Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003;63(8):1727-30.
33. Robbins KT, Shaha AR, Medina JE, Califano JA, Wolf GT, Ferlito A, et al. Consensus statement on the classification and terminology of neck dissection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;134(5):536-8.
34. Verschuur HP, Irish JC, O'Sullivan B, Goh C, Gullane PJ, Pintilie M. A matched control study of treatment outcome in young patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope.* 1999;109(2 Pt 1):249-58.
35. Siegelmann-Danieli N, Hanlon A, Ridge JA, Padmore R, Fein DA, Langer CJ. Oral tongue cancer in patients less than 45 years old: institutional experience and comparison with older patients. *J Clin Oncol.* 1998;16(2):745-53.
36. Pignon JP, le Maitre A, Maillard E, Bourhis J, Group M-NC. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol.* 2009;92(1):4-14.
37. Morse DE, Kerr AR. Disparities in oral and pharyngeal cancer incidence, mortality and survival among black and white Americans. *J Am Dent Assoc.* 2006;137(2):203-12.
38. Settle K, Posner MR, Schumaker LM, Tan M, Suntharalingam M, Goloubeva O, et al. Racial survival disparity in head and neck cancer results from low prevalence of human papillomavirus infection in black oropharyngeal cancer patients. *Cancer Prev Res (Phila).* 2009;2(9):776-81.
39. van der Voet JC, Keus RB, Hart AA, Hilgers FJ, Bartelink H. The impact of treatment time and smoking on local control and complications in T1 glottic cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1998;42(2):247-55.
40. Day GL, Blot WJ, Shore RE, McLaughlin JK, Austin DF, Greenberg RS, et al. Second cancers following oral and pharyngeal cancers: role of tobacco and alcohol. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86(2):131-7.
41. Piccirillo JF, Tierney RM, Costas I, Grove L, Spitznagel EL, Jr. Prognostic importance of comorbidity in a hospital-based cancer registry. *JAMA.* 2004;291(20):2441-7.
42. Rabinovitch R, Grant B, Berkey BA, Raben D, Ang KK, Fu KK, et al. Impact of nutrition support on treatment outcome in patients with locally advanced head and neck squamous cell cancer treated with definitive radiotherapy: a secondary analysis of RTOG trial 90-03. *Head Neck.* 2006;28(4):287-96.
43. Moore C, Flynn MB, Greenberg RA. Evaluation of size in prognosis of oral cancer. *Cancer.* 1986;58(1):158-62.

44. Mendenhall WM, Morris CG, Amdur RJ, Hinerman RW, Mancuso AA. Parameters that predict local control after definitive radiotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*. 2003;25(7):535-42.
45. Jacobs JR, Ahmad K, Casiano R, Schuller DE, Scott C, Laramore GE, et al. Implications of positive surgical margins. *Laryngoscope*. 1993;103(1 Pt 1):64-8.
46. Zelefsky MJ, Harrison LB, Fass DE, Armstrong JG, Shah JP, Strong EW. Postoperative radiation therapy for squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx: impact of therapy on patients with positive surgical margins. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1993;25(1):17-21.
47. Fritsch VA, Lentsch EJ. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck: location means everything. *J Surg Oncol*. 2014;109(6):616-22.
48. Soriano E, Faure C, Lantuejoul S, Reyt E, Bolla M, Brambilla E, et al. Course and prognosis of basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study of 62 patients. *Eur J Cancer*. 2008;44(2):244-50.
49. Mamelle G, Pampurik J, Luboinski B, Lancar R, Lusinchi A, Bosq J. Lymph node prognostic factors in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Surg*. 1994;168(5):494-8.
50. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB. Regional lymph node involvement and its significance in the development of distant metastases in head and neck carcinoma. *Cancer*. 1993;71(2):452-6.
51. Puri SK, Fan CY, Hanna E. Significance of extracapsular lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;11(2):119-23.
52. Pinsolle J, Pinsolle V, Majoufre C, Duroux S, Demeaux H, Siberchicot F. Prognostic value of histologic findings in neck dissections for squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997;123(2):145-8.
53. Temam S, Flahault A, Perie 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. *J Clin Oncol*. 2000;18(2):385-94.
54. Couture C, Raybaud-Diogene H, Tetu B, Bairati I, Murry D, Allard J, et al. p53 and Ki-67 as markers of radioresistance in head and neck carcinoma. *Cancer*. 2002;94(3):713-22.
55. Wakisaka N, Wen QH, Yoshizaki T, Nishimura T, Furukawa M, Kawahara E, et al. Association of vascular endothelial growth factor expression with angiogenesis and lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope*. 1999;109(5):810-4.
56. Kyzas PA, Cunha IW, Ioannidis JP. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Clin Cancer Res*. 2005;11(4):1434-40.
57. Mineta H, Miura K, Takebayashi S, Ueda Y, Misawa K, Harada H, et al. Cyclin D1 overexpression correlates with poor prognosis in patients with tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2000;36(2):194-8.

58. Yoo SS, Carter D, Turner BC, Sasaki CT, Son YH, Wilson LD, et al. Prognostic significance of cyclin D1 protein levels in early-stage larynx cancer treated with primary radiation. *Int J Cancer*. 2000;90(1):22-8.
59. Hwang CF, Cho CL, Huang CC, Wang JS, Shih YL, Su CY, et al. Loss of cyclin D1 and p16 expression correlates with local recurrence in nasopharyngeal carcinoma following radiotherapy. *Ann Oncol*. 2002;13(8):1246-51.
60. Capaccio P, Pruneri G, Carboni N, Pagliari AV, Quatela M, Cesana BM, et al. Cyclin D1 expression is predictive of occult metastases in head and neck cancer patients with clinically negative cervical lymph nodes. *Head Neck*. 2000;22(3):234-40.
61. Myo K, Uzawa N, Miyamoto R, Sonoda I, Yuki Y, Amagasa T. Cyclin D1 gene numerical aberration is a predictive marker for occult cervical lymph node metastasis in TNM Stage I and II squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*. 2005;104(12):2709-16.
62. Eriksen JG, Steiniche T, Askaa J, Alsner J, Overgaard J. The prognostic value of epidermal growth factor receptor is related to tumor differentiation and the overall treatment time of radiotherapy in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;58(2):561-6.
63. Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, et al. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res*. 2002;62(24):7350-6.
64. Ragin CC, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2007;121(8):1813-20.
65. Licitra L, Perrone F, Bossi P, Suardi S, Mariani L, Artusi R, et al. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(36):5630-6.
66. Hafkamp HC, Manni JJ, Haesevoets A, Voogd AC, Schepers M, Bot FJ, et al. Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. *Int J Cancer*. 2008;122(12):2656-64.
67. Henstrom DK, Moore EJ, Olsen KD, Kasperbauer JL, McGree ME. Transoral resection for squamous cell carcinoma of the base of the tongue. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009;135(12):1231-8.
68. Patel SA, Magnuson JS, Holsinger FC, Karni RJ, Richmon JD, Gross ND, et al. Robotic surgery for primary head and neck squamous cell carcinoma of unknown site. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013;139(11):1203-11.
69. Weinstein GS, O'Malley BW, Jr., Magnuson JS, Carroll WR, Olsen KD, Daio L, et al. Transoral robotic surgery: a multicenter study to assess feasibility, safety, and surgical margins. *Laryngoscope*. 2012;122(8):1701-7.
70. Arshad H, Durmus K, Ozer E. Transoral robotic resection of selected parapharyngeal space tumors. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2013;270(5):1737-40.

71. Huang DT, Johnson CR, Schmidt-Ullrich R, Grimes M. Postoperative radiotherapy in head and neck carcinoma with extracapsular lymph node extension and/or positive resection margins: a comparative study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1992;23(4):737-42.
72. Peters LJ, Goepfert H, Ang KK, Byers RM, Maor MH, Guillaumondegui O, et al. Evaluation of the dose for postoperative radiation therapy of head and neck cancer: first report of a prospective randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1993;26(1):3-11.
73. J GJaGdC, editor. Atlas integral de tumores de cabeza y cuello2010.
74. El-Sayed S, Nelson N. Adjuvant and adjunctive chemotherapy in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck region. A meta-analysis of prospective and randomized trials. *J Clin Oncol.* 1996;14(3):838-47.
75. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, et al. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2004;350(19):1937-44.
76. Bernier J, Dommene C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefebvre JL, Greiner RH, et al. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2004;350(19):1945-52.
77. Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, Pajak TF, Weber R, Morrison W, et al. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med.* 2003;349(22):2091-8.
78. Forastiere AA, Zhang Q, Weber RS, Maor MH, Goepfert H, Pajak TF, et al. Long-term results of RTOG 91-11: a comparison of three nonsurgical treatment strategies to preserve the larynx in patients with locally advanced larynx cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31(7):845-52.
79. Argiris A, Brockstein BE, Haraf DJ, Stenson KM, Mittal BB, Kies MS, et al. Competing causes of death and second primary tumors in patients with locoregionally advanced head and neck cancer treated with chemoradiotherapy. *Clin Cancer Res.* 2004;10(6):1956-62.
80. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2006;354(6):567-78.
81. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2008;359(11):1116-27.
82. Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, Gorlia T, Mesia R, Degardin M, et al. Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2007;357(17):1695-704.
83. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet.* 2008;371(9625):1695-709.
84. Lewanski CR, Gullick WJ. Radiotherapy and cellular signalling. *Lancet Oncol.* 2001;2(6):366-70.

85. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(8):573-84.
86. Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevedo C, Perez JM. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem*. 2007;7(1):3-18.
87. Thoms J, Bristow RG. DNA repair targeting and radiotherapy: a focus on the therapeutic ratio. *Semin Radiat Oncol*. 2010;20(4):217-22.
88. Carles J, Monzo M, Amat M, Jansa S, Artells R, Navarro A, et al. Single-nucleotide polymorphisms in base excision repair, nucleotide excision repair, and double strand break genes as markers for response to radiotherapy in patients with Stage I to II head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006;66(4):1022-30.
89. Jun HJ, Ahn MJ, Kim HS, Yi SY, Han J, Lee SK, et al. ERCC1 expression as a predictive marker of squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based concurrent chemoradiation. *Br J Cancer*. 2008;99(1):167-72.
90. Chan SH, Cheung FM, Ng WT, Choi CW, Cheung KN, Yiu KH, et al. Can the analysis of ERCC1 expression contribute to individualized therapy in nasopharyngeal carcinoma? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011;79(5):1414-20.
91. Vens C, Begg AC. Targeting base excision repair as a sensitization strategy in radiotherapy. *Semin Radiat Oncol*. 2010;20(4):241-9.
92. Lukas JBaJ. The DNA damage response in tumorigenesis and cancer treatment. *Nature reviews cancer*.
93. Hu JJ, Smith TR, Miller MS, Mohrenweiser HW, Golden A, Case LD. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis*. 2001;22(6):917-22.
94. Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA. The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK. *Cancer Lett*. 2000;159(1):63-71.
95. Geisler SA, Olshan AF, Cai J, Weissler M, Smith J, Bell D. Glutathione S-transferase polymorphisms and survival from head and neck cancer. *Head Neck*. 2005;27(3):232-42.
96. Quintela-Fandino M, Hitt R, Medina PP, Gamarra S, Manso L, Cortes-Funes H, et al. DNA-repair gene polymorphisms predict favorable clinical outcome among patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based induction chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2006;24(26):4333-9.
97. Gal TJ, Huang WY, Chen C, Hayes RB, Schwartz SM. DNA repair gene polymorphisms and risk of second primary neoplasms and mortality in oral cancer patients. *Laryngoscope*. 2005;115(12):2221-31.
98. Martin LM, Marples B, Coffey M, Lawler M, Lynch TH, Hollywood D, et al. DNA mismatch repair and the DNA damage response to ionizing radiation: making sense of apparently conflicting data. *Cancer Treat Rev*. 2010;36(7):518-27.
99. Schofield MJ, Hsieh P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu Rev Microbiol*. 2003;57:579-608.

100. Barker CA, Powell SN. Enhancing radiotherapy through a greater understanding of homologous recombination. *Semin Radiat Oncol.* 2010;20(4):267-73 e3.
101. Zhu Y, Hu J, Hu Y, Liu W. Targeting DNA repair pathways: a novel approach to reduce cancer therapeutic resistance. *Cancer Treat Rev.* 2009;35(7):590-6.
102. Kuo MT, Chen HH, Song IS, Savaraj N, Ishikawa T. The roles of copper transporters in cisplatin resistance. *Cancer Metastasis Rev.* 2007;26(1):71-83.
103. Komatsu M, Sumizawa T, Mutoh M, Chen ZS, Terada K, Furukawa T, et al. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance. *Cancer Res.* 2000;60(5):1312-6.
104. Nakayama K, Kanzaki A, Ogawa K, Miyazaki K, Neamati N, Takebayashi Y. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP. *Int J Cancer.* 2002;101(5):488-95.
105. Goto S, Iida T, Cho S, Oka M, Kohno S, Kondo T. Overexpression of glutathione S-transferase pi enhances the adduct formation of cisplatin with glutathione in human cancer cells. *Free Radic Res.* 1999;31(6):549-58.
106. Booton R, Ward T, Heighway J, Ashcroft L, Morris J, Thatcher N. Glutathione-S-transferase P1 isoenzyme polymorphisms, platinum-based chemotherapy, and non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2006;1(7):679-83.
107. Yang P, Ebbert JO, Sun Z, Weinshilboum RM. Role of the glutathione metabolic pathway in lung cancer treatment and prognosis: a review. *J Clin Oncol.* 2006;24(11):1761-9.
108. Duarte EC, Ribeiro DC, Gomez MV, Ramos-Jorge ML, Gomez RS. Genetic polymorphisms of carcinogen metabolizing enzymes are associated with oral leukoplakia development and p53 overexpression. *Anticancer Res.* 2008;28(2A):1101-6.
109. Safaei R, Howell SB. Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005;53(1):13-23.
110. Pignon JP, 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. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet.* 2000;355(9208):949-55.
111. Adelstein DJ, Li Y, Adams GL, Wagner H, Jr., Kish JA, Ensley JF, et al. An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21(1):92-8.
112. Lefebvre JL. Current clinical outcomes demand new treatment options for SCCHN. *Ann Oncol.* 2005;16 Suppl 6:vi7-vi12.
113. Simard EP TL, Jemal A. International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol.* 2014;50 (5):387-403.
114. Rettig EM, D'Souza G. Epidemiology of head and neck cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2015;24(3):379-96.

115. Blanchard P, Baujat B, Holostenco V, Bourredjem A, Baey C, Bourhis J, et al. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): a comprehensive analysis by tumour site. *Radiother Oncol.* 2011;100(1):33-40.
116. Nogueira GA, Lourenco GJ, Oliveira CB, Marson FA, Lopes-Aguiar L, Costa EF, et al. Association between genetic polymorphisms in DNA mismatch repair-related genes with risk and prognosis of head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2015;137(4):810-8.
117. Lu B, Li J, Gao Q, Yu W, Yang Q, Li X. Laryngeal cancer risk and common single nucleotide polymorphisms in nucleotide excision repair pathway genes ERCC1, ERCC2, ERCC3, ERCC4, ERCC5 and XPA. *Gene.* 2014;542(1):64-8.
118. Lou Y, Peng WJ, Cao DS, Xie J, Li HH, Jiang ZX. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and head and neck cancer risk: an updated meta-analysis including 16344 subjects. *PLoS One.* 2013;8(9):e74059.
119. Wijnhoven SW, Hoogervorst EM, de Waard H, van der Horst GT, van Steeg H. Tissue specific mutagenic and carcinogenic responses in NER defective mouse models. *Mutat Res.* 2007;614(1-2):77-94.
120. Niedernhofer LJ, Odijk H, Budzowska M, van Drunen E, Maas A, Theil AF, et al. The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol.* 2004;24(13):5776-87.
121. Yin JY, Huang Q, Zhao YC, Zhou HH, Liu ZQ. Meta-analysis on pharmacogenetics of platinum-based chemotherapy in non small cell lung cancer (NSCLC) patients. *PLoS One.* 2012;7(6):e38150.
122. Metzger R, Warnecke-Eberz U, Alakus H, Kutting F, Brabender J, Vallbohmer D, et al. Neoadjuvant radiochemotherapy in adenocarcinoma of the esophagus: ERCC1 gene polymorphisms for prediction of response and prognosis. *J Gastrointest Surg.* 2012;16(1):26-34; discussion
123. Doll CM, Aquino-Parsons C, Pintilie M, Klimowicz AC, Petrillo SK, Milosevic M, et al. The significance of tumoral ERCC1 status in patients with locally advanced cervical cancer treated with chemoradiation therapy: a multicenter clinicopathologic analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013;85(3):721-7.
124. Su D, Ma S, Liu P, Jiang Z, Lv W, Zhang Y, et al. Genetic polymorphisms and treatment response in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2007;56(2):281-8.
125. Bradbury PA, Kulke MH, Heist RS, Zhou W, Ma C, Xu W, et al. Cisplatin pharmacogenetics, DNA repair polymorphisms, and esophageal cancer outcomes. *Pharmacogenet Genomics.* 2009;19(8):613-25.
126. Chen S, Huo X, Lin Y, Ban H, Lin Y, Li W, et al. Association of MDR1 and ERCC1 polymorphisms with response and toxicity to cisplatin-based chemotherapy in non-small-cell lung cancer patients. *Int J Hyg Environ Health.* 2010;213(2):140-5.
127. Isla D, Sarries C, Rosell R, Alonso G, Domine M, Taron M, et al. Single nucleotide polymorphisms and outcome in docetaxel-cisplatin-treated advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2004;15(8):1194-203.

128. Song X, Sturgis EM, Jin L, Wang Z, Wei Q, Li G. Variants in nucleotide excision repair core genes and susceptibility to recurrence of squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Int J Cancer*. 2013;133(3):695-704.
129. Erculj N, Kovac V, Hmeljak J, Dolzan V. The influence of platinum pathway polymorphisms on the outcome in patients with malignant mesothelioma. *Ann Oncol*. 2012;23(4):961-7.
130. Khrunin AV, Moisseev A, Gorbunova V, Limborska S. Genetic polymorphisms and the efficacy and toxicity of cisplatin-based chemotherapy in ovarian cancer patients. *Pharmacogenomics J*. 2010;10(1):54-61.
131. Suk R, Gurubhagavatula S, Park S, Zhou W, Su L, Lynch TJ, et al. Polymorphisms in ERCC1 and grade 3 or 4 toxicity in non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2005;11(4):1534-8.
132. Tirode F, Busso D, Coin F, Egly JM. Reconstitution of the transcription factor TFIIH: assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7. *Mol Cell*. 1999;3(1):87-95.
133. Qiao Y, Spitz MR, Shen H, Guo Z, Shete S, Hedayati M, et al. Modulation of repair of ultraviolet damage in the host-cell reactivation assay by polymorphic XPC and XPD/ERCC2 genotypes. *Carcinogenesis*. 2002;23(2):295-9.
134. Butkiewicz D, Rusin M, Enewold L, Shields PG, Chorazy M, Harris CC. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer. *Carcinogenesis*. 2001;22(4):593-7.
135. Liu C, Yin Q, Jiao G, Zhou X, Ying M, Gao W, et al. Association between the XRCC1 Arg399Gln polymorphism and head and neck cancer susceptibility: a meta-analysis based on case-control studies. *DNA Cell Biol*. 2014;33(6):378-87.
136. Zhong S, Nukui T, Buch S, Diergaarde B, Weissfeld LA, Grandis J, et al. Effects of ERCC2 Lys751Gln (A35931C) and CCND1 (G870A) polymorphism on outcome of advanced-stage squamous cell carcinoma of the head and neck are treatment dependent. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20(11):2429-37.
137. Hopkins J, Cescon DW, Tse D, Bradbury P, Xu W, Ma C, et al. Genetic polymorphisms and head and neck cancer outcomes: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17(3):490-9.
138. Chen X, Sun H, Ren S, Kim Curran V, Zhang L, Zhou S, et al. Association of XRCC3 and XPD751 SNP with efficacy of platinum-based chemotherapy in advanced NSCLC patients. *Clin Transl Oncol*. 2012;14(3):207-13.
139. Gurubhagavatula S, Liu G, Park S, Zhou W, Su L, Wain JC, et al. XPD and XRCC1 genetic polymorphisms are prognostic factors in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with platinum chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2004;22(13):2594-601.
140. Sullivan I, Salazar J, Majem M, Pallares C, Del Rio E, Paez D, et al. Pharmacogenetics of the DNA repair pathways in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Cancer Lett*. 2014;353(2):160-6.
141. Yang Y, Xian L. The association between the ERCC1/2 polymorphisms and the clinical outcomes of the platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer (NSCLC): a systematic review and meta-analysis. *Tumour Biol*. 2014;35(4):2905-21.

142. Zhou M, Ding YJ, Feng Y, Zhang QR, Xiang Y, Wan HY. Association of xeroderma pigmentosum group D (Asp312Asn, Lys751Gln) and cytidine deaminase (Lys27Gln, Ala70Thr) polymorphisms with outcome in Chinese non-small cell lung cancer patients treated with cisplatin-gemcitabine. *Genet Mol Res.* 2014;13(2):3310-8.
143. Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E, Mey V, Laan AC, Nannizzi S, et al. Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2008;14(6):1797-803.
144. Caiola E, Porcu L, Fruscio R, Giuliani D, Milani R, Torri V, et al. DNA-damage response gene polymorphisms and therapeutic outcomes in ovarian cancer. *Pharmacogenomics J.* 2013;13(2):159-72.
145. Cui Z, Yin Z, Li X, Wu W, Guan P, Zhou B. Association between polymorphisms in XRCC1 gene and clinical outcomes of patients with lung cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer.* 2012;12:71.
146. Ghazali N, Shaw RJ, Rogers SN, Risk JM. Genomic determinants of normal tissue toxicity after radiotherapy for head and neck malignancy: a systematic review. *Oral Oncol.* 2012;48(11):1090-100.
147. Barnett GC, West CM, Dunning AM, Elliott RM, Coles CE, Pharoah PD, et al. Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(2):134-42.
148. Pratesi N, Mangoni M, Mancini I, Paiar F, Simi L, Livi L, et al. Association between single nucleotide polymorphisms in the XRCC1 and RAD51 genes and clinical radiosensitivity in head and neck cancer. *Radiother Oncol.* 2011;99(3):356-61.
149. Lundberg M, Saarilahti K, Makitie AA, Mattila PS. TGFbeta1 genetic polymorphism is associated with survival in head and neck squamous cell carcinoma independent of the severity of chemoradiotherapy induced mucositis. *Oral Oncol.* 2010;46(5):369-72.
150. Werbrouck J, De Ruyck K, Duprez F, Veldeman L, Claes K, Van Eijkeren M, et al. Acute normal tissue reactions in head-and-neck cancer patients treated with IMRT: influence of dose and association with genetic polymorphisms in DNA DSB repair genes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009;73(4):1187-95.
151. Brenneman MA, Weiss AE, Nickoloff JA, Chen DJ. XRCC3 is required for efficient repair of chromosome breaks by homologous recombination. *Mutat Res.* 2000;459(2):89-97.
152. Zschenker O, Raabe A, Boeckelmann IK, Borstelmann S, Szymczak S, Wellek S, et al. Association of single nucleotide polymorphisms in ATM, GSTP1, SOD2, TGFB1, XPD and XRCC1 with clinical and cellular radiosensitivity. *Radiother Oncol.* 2010;97(1):26-32.
153. Venkatesh GH, Manjunath VB, Mumbreakar KD, Negi H, Fernandes DJ, Sharan K, et al. Polymorphisms in radio-responsive genes and its association with acute toxicity among head and neck cancer patients. *PLoS One.* 2014;9(3):e89079.
154. Khrunin AV, Khokhrin DV, Moisseev AA, Gorbunova VA, Limborska SA. Pharmacogenomic assessment of cisplatin-based chemotherapy outcomes in ovarian cancer. *Pharmacogenomics.* 2014;15(3):329-37.

155. Dmitriev OY. Mechanism of tumor resistance to cisplatin mediated by the copper transporter ATP7B. *Biochem Cell Biol.* 2011;89(2):138-47.
156. He YJ, Winham SJ, Hoskins JM, Glass S, Paul J, Brown R, et al. Carboplatin/taxane-induced gastrointestinal toxicity: a pharmacogenomics study on the SCOTROC1 trial. *Pharmacogenomics J.* 2015.
157. Marsh S, Paul J, King CR, Gifford G, McLeod HL, Brown R. Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome after platinum plus taxane chemotherapy in ovarian cancer: the Scottish Randomised Trial in Ovarian Cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(29):4528-35.
158. Wu X, Gu J, Wu TT, Swisher SG, Liao Z, Correa AM, et al. Genetic variations in radiation and chemotherapy drug action pathways predict clinical outcomes in esophageal cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(23):3789-98.
159. Lamba JK, Fridley BL, Ghosh TM, Yu Q, Mehta G, Gupta P. Genetic variation in platinating agent and taxane pathway genes as predictors of outcome and toxicity in advanced non-small-cell lung cancer. *Pharmacogenomics.* 2014;15(12):1565-74.
160. Wei HB, Lu XS, Shang LH, Xu G, Hu J, Che DH, et al. Polymorphisms of ERCC1 C118T/C8092A and MDR1 C3435T predict outcome of platinum-based chemotherapies in advanced non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Arch Med Res.* 2011;42(5):412-20.
161. Vulsteke C, Lambrechts D, Dieudonne A, Hatse S, Brouwers B, van Brussel T, et al. Genetic variability in the multidrug resistance associated protein-1 (ABCC1/MRP1) predicts hematological toxicity in breast cancer patients receiving (neo-)adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide (FEC). *Ann Oncol.* 2013;24(6):1513-25.
162. Hinoshita E, Uchiumi T, Taguchi K, Kinukawa N, Tsuneyoshi M, Maehara Y, et al. Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2000;6(6):2401-7.
163. Han B, Gao G, Wu W, Gao Z, Zhao X, Li L, et al. Association of ABCC2 polymorphisms with platinum-based chemotherapy response and severe toxicity in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2011;72(2):238-43.
164. Sun N, Sun X, Chen B, Cheng H, Feng J, Cheng L, et al. MRP2 and GSTP1 polymorphisms and chemotherapy response in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;65(3):437-46.
165. Yang XS MS, Hitoshi K et al. Single nucleotide polymorphisms in MRP2 gene and their significance on chemosensitivity of advanced ovarian cancer. *J Pract Obstet Gynecol.* 2004;20(23):153-5.
166. Frankmoelle WP, Medina JC, Shan B, Narbut MR, Beckmann H. Glutathione S-transferase metabolism of the antineoplastic pentafluorophenylsulfonamide in tissue culture and mice. *Drug Metab Dispos.* 2000;28(8):951-8.

167. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem.* 1997;272(15):10004-12.
168. Ruwali M, Singh M, Pant MC, Parmar D. Polymorphism in glutathione S-transferases: susceptibility and treatment outcome for head and neck cancer. *Xenobiotica.* 2011;41(12):1122-30.
169. Chen MK, Tsai HT, Chung TT, Su SC, Kao TY, Tseng HC, et al. Glutathione S-transferase P1 and alpha gene variants; role in susceptibility and tumor size development of oral cancer. *Head Neck.* 2010;32(8):1079-87.
170. Lang J, Song X, Cheng J, Zhao S, Fan J. Association of GSTP1 Ile105Val polymorphism and risk of head and neck cancers: a meta-analysis of 28 case-control studies. *PLoS One.* 2012;7(11):e48132.
171. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, et al. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(12):1239-48.
172. Kim HS, Kim MK, Chung HH, Kim JW, Park NH, Song YS, et al. Genetic polymorphisms affecting clinical outcomes in epithelial ovarian cancer patients treated with taxanes and platinum compounds: a Korean population-based study. *Gynecol Oncol.* 2009;113(2):264-9.
173. Agostini M, Pasetto LM, Pucciarelli S, Terrazzino S, Ambrosi A, Bedin C, et al. Glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism is associated with haematological toxicity in elderly rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiotherapy. *Drugs Aging.* 2008;25(6):531-9.
174. Yoon HH, Catalano P, Gibson MK, Skaar TC, Philips S, Montgomery EA, et al. Genetic variation in radiation and platinum pathways predicts severe acute radiation toxicity in patients with esophageal adenocarcinoma treated with cisplatin-based preoperative radiochemotherapy: results from the Eastern Cooperative Oncology Group. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;68(4):863-70.
175. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(3):161-74.
176. Leinonen T, Pirinen R, Bohm J, Johansson R, Kosma VM. Increased expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) predicts tumour recurrence and unfavourable outcome in non-small cell lung cancer. *Histol Histopathol.* 2008;23(6):693-700.
177. Yorioka CW, Coletta RD, Alves F, Nishimoto IN, Kowalski LP, Graner E. Matrix metalloproteinase-2 and -9 activities correlate with the disease-free survival of oral squamous cell carcinoma patients. *Int J Oncol.* 2002;20(1):189-94.
178. Yamamura T, Nakanishi K, Hiroi S, Kumaki F, Sato H, Aida S, et al. Expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase and metalloproteinase-2 in nonsmall cell lung carcinomas. *Lung Cancer.* 2002;35(3):249-55.
179. Qian Q, Wang Q, Zhan P, Peng L, Wei SZ, Shi Y, et al. The role of matrix metalloproteinase 2 on the survival of patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Cancer Invest.* 2010;28(6):661-9.

180. Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol.* 2000;19(7):623-9.
181. Zhao X, Wang X, Wu W, Gao Z, Wu J, Garfield DH, et al. Matrix metalloproteinase-2 polymorphisms and clinical outcome of Chinese patients with nonsmall cell lung cancer treated with first-line, platinum-based chemotherapy. *Cancer.* 2012;118(14):3587-98.
182. Sijbers AM, de Laat WL, Ariza RR, Biggerstaff M, Wei YF, Moggs JG, et al. Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. *Cell.* 1996;86(5):811-22.
183. Ahmad A, Robinson AR, Duensing A, van Drunen E, Beverloo HB, Weisberg DB, et al. ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol.* 2008;28(16):5082-92.
184. Vaezi A, Wang X, Buch S, Gooding W, Wang L, Seethala RR, et al. XPF expression correlates with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2011;17(16):5513-22.
185. Spinola M, Leoni V, Pignatiello C, Conti B, Ravagnani F, Pastorino U, et al. Functional FGFR4 Gly388Arg polymorphism predicts prognosis in lung adenocarcinoma patients. *J Clin Oncol.* 2005;23(29):7307-11.
186. Bange J, Prechtel D, Cheburkin Y, Specht K, Harbeck N, Schmitt M, et al. Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele. *Cancer Res.* 2002;62(3):840-7.
187. Streit S, Bange J, Fichtner A, Ihrler S, Issing W, Ullrich A. Involvement of the FGFR4 Arg388 allele in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2004;111(2):213-7.
188. Zhao H, Wang LE, Li D, Chamberlain RM, Sturgis EM, Wei Q. Genotypes and haplotypes of ERCC1 and ERCC2/XPD genes predict levels of benzo[a]pyrene diol epoxide-induced DNA adducts in cultured primary lymphocytes from healthy individuals: a genotype-phenotype correlation analysis. *Carcinogenesis.* 2008;29(8):1560-6.
189. Woelfelschneider A, Popanda O, Lilla C, Linseisen J, Mayer C, Celebi O, et al. A distinct ERCC1 haplotype is associated with mRNA expression levels in prostate cancer patients. *Carcinogenesis.* 2008;29(9):1758-64.
190. Li Y, Liu Z, Liu H, Wang LE, Tan D, Ajani JA, et al. ERCC1 and ERCC2 variants predict survival in gastric cancer patients. *PLoS One.* 2013;8(9):e71994.







