



FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Evaluación del valor pronóstico de la detección y
cuantificación de ADN circulante tumoral en
pacientes con cáncer colorrectal estadio II y III**

Código COIR: TFM.MMC.ECC.MDLA.220228

Curso: Máster en Investigación en Medicina Clínica 2021-2022

Alumno: María Dolores López Abellán

Tutor: Esther Caparrós Cayuela

1. Aspectos preliminares

■ RESUMEN

INTRODUCCIÓN. La biopsia líquida es una potencial alternativa a la biopsia de tejido con grandes ventajas: es un procedimiento no invasivo, presenta un rápido tiempo de respuesta y permite determinar el perfil molecular tumoral antes y durante el tratamiento, en el seguimiento del paciente y durante la progresión de la enfermedad. Numerosos estudios muestran al ADN circulante tumoral (ctDNA) como un potente predictor de recidiva y supervivencia tras la cirugía y la quimioterapia adyuvante en pacientes con cáncer colorrectal estadio II y III.

OBJETIVOS. Determinar el número de copias de alelo mutado en los genes *KRAS* y *BRAF* en ctDNA al diagnóstico y postcirugía y estudiar su correlación con la supervivencia global (*overall survival*, OS), la supervivencia libre de enfermedad (*disease-free survival*, DFS) y la supervivencia libre de recidiva (*recurrence-free survival*, RFS) en pacientes con cáncer colorrectal estadio II y III.

HIPÓTESIS. El ctDNA es un biomarcador pronóstico válido en pacientes con cáncer colorrectal estadio II y III, que permite estratificar a los pacientes en función del riesgo de recidiva y mortalidad, por lo que podría ser usado para guiar la toma de decisiones terapéuticas.

METODOLOGÍA. Estudio analítico observacional prospectivo de los datos obtenidos del análisis del número de copias de ctDNA de las mutaciones en el exón 12 y 13 de *KRAS* y la mutación V600E en *BRAF* mediante PCR digital en plasma doble centrifugado de pacientes con cáncer colorrectal estadio II y III al diagnóstico y postcirugía, en el Hospital General Universitario Santa Lucía de Cartagena entre enero y diciembre de 2022.

■ ABSTRACT

INTRODUCTION. Liquid biopsy is a potential alternative to tissue biopsy, accounting great advantages: it is a non-invasive process, offers a short response time and allows to determine the tumor molecular profile before and during treatment, during the following-up of the patient and at disease progression. Several studies demonstrate that circulating tumor DNA (ctDNA) is a useful recurrence and survival predictor after surgery and adjuvant chemotherapy in stage II and III colorectal cancer patients.

AIM. The aim of this study is to determine the number of copies of *KRAS* and *BRAF* genes mutated allele in ctDNA at diagnosis and after surgery and study its correlation to overall survival (OS), disease-free survival (DFS) and recurrence-free survival (RFS) in patients with stage II and III colorectal cancer.

HYPOTHESIS. ctDNA is a valid prognostic biomarker in patients with stage II and III colorectal cancer, allowing patients stratification according to the risk of recurrence and mortality, so it could be used to guide therapeutical choice during patient management.

METHODOLOGY. Observational prospective study of data obtained from the analysis of exon 12 and 13 *KRAS* and V600F *BRAF* mutations using digital PCR in doubled-centrifuged plasma samples from stage II and III colorectal cancer patients at diagnosis and after surgery, at University General Hospital Santa Lucia in Cartagena, from January to December 2022.

■ PALABRAS CLAVE/KEYWORDS

Colorectal cancer, liquid biopsy, digital PCR, circulating tumor DNA, *KRAS*, *BRAF*

ÍNDICE

1. Aspectos preliminares	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	3
PALABRAS CLAVE/KEYWORDS	3
2. Cuerpo del Trabajo de Fin de Máster	5
INTRODUCCIÓN	5
HIPÓTESIS	6
OBJETIVOS	7
MATERIAL Y MÉTODOS	7
PLAN DE TRABAJO	12
ASPECTOS ÉTICOS	14
APLICABILIDAD Y UTILIDAD DE RESULTADOS	15
EXPERIENCIA DEL EQUIPO INVESTIGADOR	16
PRESUPUESTO	17
3. Bibliografía	18
4. Anexos	20
ANEXO 1. Documento de consentimiento informado	

2. Cuerpo del Trabajo de Fin de Máster

■ INTRODUCCIÓN

La medicina personalizada en el tratamiento del paciente oncológico requiere conocer, a lo largo de la evolución de su enfermedad, los cambios dinámicos inherentes a la biología tumoral. Para ello, hasta hace algunos años tan solo contábamos con estudios en muestras de biopsia de tejido tumoral y, aunque actualmente siguen siendo el *gold standard*, tienen algunos inconvenientes (1). En concreto, en un 25% de los casos, la biopsia de tejido inicial no es informativa o no es posible realizar el perfil genómico del tumor a la progresión por la dificultad obtener una nueva biopsia (2).

La biopsia líquida aparece como una potencial alternativa a la biopsia de tejido con ciertas ventajas incuestionables: la extracción de biopsia líquida es un procedimiento no invasivo, presenta un rápido tiempo de respuesta, permite la posibilidad de evaluar el perfil genómico del tumor de forma repetida y además, mediante su estudio tenemos acceso a una mejor evaluación de la heterogeneidad y la evolución del tumor (3).

El ctDNA constituye una pequeña proporción del DNA circulante libre total, menor al 1%. Gracias a la mejora de la sensibilidad de las técnicas analíticas utilizadas (PCR digital y técnicas de secuenciación masiva (NGS), principalmente), está siendo rápidamente aceptado como una herramienta de confianza en Oncología, ofreciendo un método más sensible para la detección de malignidad en comparación con las técnicas de imagen u otras aproximaciones convencionales en algunos tipos tumorales (4).

Igualmente, la biopsia líquida es una técnica diagnóstica que permite determinar el perfil molecular tumoral antes y durante el tratamiento, en el seguimiento del paciente y durante la progresión de la enfermedad (4). Esto permite evaluar de forma repetida el perfil genómico del tumor del paciente, destacando como una herramienta prometedora para la detección de la enfermedad mínima residual, el manejo de pacientes con cáncer y la monitorización de respuestas a la terapia. Además, la evidencia actual sostiene que existe una alta concordancia entre los resultados obtenidos mediante biopsia líquida y biopsia de tejido (5).

Como muestran numerosos estudios hasta la fecha, el ctDNA resulta ser un potente predictor de recidiva y supervivencia tras la cirugía y la quimioterapia adyuvante en

pacientes con cáncer colorrectal estadio II y III, con una especificidad muy alta y una sensibilidad que mejorará con el desarrollo de la tecnología aplicada (6–9).

En la actualidad, se están desarrollando varios ensayos clínicos con grandes cohortes para estudiar la utilidad del análisis de ctDNA para evaluar la enfermedad mínima residual. Uno de ellos es el ensayo TRACC (n = 1000, NCT04050345) (10), que investiga si en pacientes con cáncer colorrectal estadio II y III que han sufrido una cirugía potencialmente curativa, la detección y cuantificación de ctDNA podría ayudar a identificar la enfermedad mínima residual y la recidiva incluso antes que otros métodos ya existentes y así ayudar a identificar el grupo de pacientes que tienen mayor probabilidad de beneficiarse de la terapia quimioterápica adyuvante y evitar el tratamiento innecesario y sus efectos adversos asociados al resto. Otros ejemplos con objetivos similares serían el ensayo ADNCirc (n = 473; NCT02813928), el ensayo clínico aleatorizado COBRA (n = 1,408; NCT0406810), el ensayo CIRCULATE (n = 1,980; NCT04120701), el DYNAMIC-II (n = 450; ACTRN12615000381583) y DYNAMIC-III (n = 1,000; ACTRN12617001566325) (4,11) y el ensayo MEDOCC-CrEATE (n = 1320; NL6281/NTR6455), que aportará información sobre el beneficio del tratamiento quimioterápico adyuvante guiado por ctDNA en pacientes con cáncer colorrectal estadio II (12).

En el futuro, será necesario realizar un mayor número de estudios prospectivos y ensayos clínicos aleatorizados y estudiar los resultados de aquellos ensayos clínicos que ya se encuentran en marcha para evaluar la aplicabilidad del este biomarcador para conocer el pronóstico del paciente y guiar la escalada o desescalada terapéutica en función del status ctDNA postquirúrgico.

■ HIPÓTESIS

El análisis del ctDNA es un biomarcador pronóstico válido en pacientes con cáncer colorrectal estadio II y III, que permite estratificar a los pacientes en función del riesgo de recidiva y mortalidad, por lo que podría ser usado para guiar la toma de decisiones terapéuticas en el manejo del paciente.

■ OBJETIVOS

El objetivo principal del estudio es evaluar el valor pronóstico de la determinación de ctDNA al diagnóstico y postcirugía en términos de supervivencia global (*overall survival*, OS), supervivencia libre de enfermedad (*disease-free survival*, DFS) y supervivencia libre de recidiva (*recurrence-free survival*, RFS) para ayudar al manejo de pacientes con cáncer colorrectal estadio II y III.

Los objetivos específicos serán:

- Determinar la proporción de ctDNA detectable al diagnóstico y postcirugía y estudiar su correlación con la OS, la DFS y la RFS en pacientes con cáncer colorrectal estadio II y III.
- Determinar el número de copias de ctDNA al diagnóstico y postcirugía y estudiar su correlación con la OS, la DFS y la RFS en pacientes con cáncer colorrectal estadio II y III.

■ MATERIAL Y MÉTODOS

- Diseño (tipo de estudio)

Estudio analítico observacional de seguimiento, prospectivo o de cohortes, de los datos obtenidos tras el muestreo y análisis del número de copias de ctDNA de las mutaciones en el exón 12 y 13 de *KRAS* y la mutación V600E en *BRAF* en plasma doble centrifugado, tomadas de pacientes con cáncer colorrectal estadio II y III en el momento del diagnóstico y postcirugía, en el Hospital General Universitario Santa Lucía de Cartagena entre los meses de enero y diciembre de 2022. Estos datos se contrastarán con los datos clínicos de OS, DFS y RFS durante un seguimiento de dos años de duración, a partir de la finalización de la terapia con intención curativa.

- Lugar (contexto)

El estudio se llevará a cabo en el Hospital General Universitario Santa Lucía de Cartagena, amparado por la Sección de Biología Molecular del Servicio de Análisis

Clínicos y en colaboración con el Servicio de Oncología Médica y el Servicio de Anatomía Patológica.

- Tiempo de ejecución

El tiempo de ejecución del estudio abarcará un año de reclutamiento de pacientes (de enero a diciembre de 2022), más dos años de seguimiento de cada paciente a estudio a partir de la fecha de cirugía de resección curativa y/o finalización del tratamiento quimioterápico coadyuvante. Por lo tanto, el estudio tendrá una duración aproximada de 3 años para la recogida y análisis de las muestras. Además, se prevé invertir de 6 a 12 meses más para el análisis de datos, elaboración de informes y comunicación de los resultados, con un total de 4 años.

- Sujetos (criterios de inclusión, exclusión, número y muestreo)

Para estudiar el valor del ctDNA como factor pronóstico en cáncer colorrectal, se incluirá en el estudio una población homogénea de pacientes con cáncer colorrectal estadio II y III sometidos a cirugía de resección curativa, que posteriormente reciban o no tratamiento quimioterápico coadyuvante, entre enero y diciembre de 2022 y que cumplan con los siguientes criterios:

o Criterios de inclusión:

- edad >18 años;
- pacientes con diagnóstico *de novo* de cáncer colorrectal estadio II y III;
- de los que se reciban al menos 10 mL de plasma en el momento del diagnóstico y/o postcirugía;
- y capaces de dar consentimiento informado.

o Criterios de exclusión:

- pacientes con cáncer colorrectal estadio I y IV o estadio II y III diagnosticados antes del inicio del estudio;
- pacientes con muestras postquirúrgicas recibidas más de 8 semanas después de la cirugía;

- pacientes con muestras insuficientes para el análisis de ctDNA (<4 mL de plasma);
- pacientes que no firmen el consentimiento informado.

El tamaño muestral se ha calculado empleando el programa OpenEpi, de acceso abierto, tomando como referencia de estimación el *hazard ratio* (HR) obtenido en un metaanálisis publicado recientemente (13), en el que al estudiar el pronóstico en términos de RFS de pacientes con cáncer colorrectal con ctDNA positivo tras la cirugía, obtienen un HR de 7.26, 95% CI: 5.48– 9.62, $p < 0.05$. Según esto, el tamaño muestral total estimado sería de 54 según el método de Kelsey. Recogeremos muestras de plasma de estos pacientes de forma prospectiva y solo existirá este grupo de pacientes a estudio.

- Variables a estudio

Las variables que se recogerán en el estudio son:

- Datos demográficos del paciente (edad al diagnóstico, sexo)
- La proporción de ctDNA detectable en pacientes con cáncer colorrectal estadio II y III al diagnóstico y postcirugía.
- El valor de ctDNA en plasma (número de copias del alelo mutado) de los pacientes incluidos en el estudio al diagnóstico y postcirugía. Esta variable se expresará como frecuencia alélica de la variante (VAF), esto es, el porcentaje del alelo mutado del gen a estudio respecto al alelo *wildtype* en ctDNA.
- Los datos de supervivencia total, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia libre de recidiva de los pacientes.

- Recogida de variables

- Recogida de muestras: se recibirán muestras de plasma en tubos con EDTA-K2 en el laboratorio de Análisis Clínicos del hospital, se someterán a una doble centrifugación y serán congeladas a -80°C hasta su análisis. Las muestras serán recogidas por personal a cargo del Servicio de

Oncología del hospital, previo consentimiento informado de los pacientes incluidos en el estudio, al diagnóstico y postcirugía.

- Extracción de ctDNA. La extracción de ADN libre circulante se realizará mediante partículas magnéticas empleando el kit específico de extracción de ADN libre circulante (QIASymphony DSP Circulating DNA) en el equipo automatizado QiaSymphony de Qiagen.
- Cuantificación de ADN libre circulante: se extraerá el ADN circulante según el método descrito y se cuantificará el mediante un método fluorimétrico optimizado en el laboratorio de investigación de nuestro servicio, Invitrogen Qubit.
- Estudio de mutaciones oncogénicas en ctDNA en plasma: determinación del número de copias de ctDNA de las mutaciones en el exón 12 y 13 de KRAS y la mutación V600E en BRAF en plasma doble centrifugado. La detección y cuantificación de mutaciones oncogénicas, mediante el sistema QX200 Droplet Digital PCR Bio-Rad.

- Recopilación de datos clínicos

Una vez disponibles los resultados moleculares, se realizarán estudios de correlación entre los hallazgos moleculares en ctDNA y datos de OS, DFS y RFS de los pacientes, realizando un seguimiento máximo de dos años tras la cirugía y/o terapia quimioterápica adyuvante, consultando la Historia Clínica Electrónica en el sistema informático hospitalario *Selene*.

- Elaboración de la base de datos a nivel analítico y clínico

Se elaborará una base de datos clínica con las principales variables clínicas en cáncer colorrectal, en concreto los datos de supervivencia total, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia libre de recidiva de los pacientes. Todos los pacientes serán incluidos en esta base de datos para su posterior correlación con los hallazgos moleculares.

- Análisis estadístico de los datos obtenidos y elaboración de informes

La positividad de ctDNA con mutaciones oncogénicas y el número de copias de alelos mutados respecto al alelo *wildtype* (VAF), se correlacionarán con los datos de DFS, RFS y OS en la serie clínica.

El análisis de supervivencia se realizará mediante el método de Kaplan Meier, se representarán gráficamente los resultados en curvas de supervivencia y se compararán las curvas de supervivencia de pacientes con niveles de ctDNA elevados y bajos mediante el test Log Rank. Se realizará el estudio de regresión de riesgos proporcionales de Cox para calcular el riesgo relativo o *hazard ratio*, con su correspondiente intervalo de confianza. Los valores p se determinarán como estadísticamente significativos cuando el intervalo de confianza al 95% del HR no incluya 1.

- Dificultades y limitaciones

La mayor dificultad a la que prevemos que tendremos que enfrentarnos durante el desarrollo del estudio es la recogida de las muestras en los tiempos adecuados. En especial, consideramos de especial importancia recoger las muestras postquirúrgicas no más de 8 semanas tras la cirugía, pues un análisis posterior del ctDNA podría no ser representativo del momento en cuestión, según se ha descrito previamente en la bibliografía (4). Dado que se trata de un proyecto que involucra a varios servicios clínicos, resulta un reto encontrar un acuerdo en el protocolo de recogida de muestras que resulte a la par, cómodo para el personal clínico colaborador y cómodo para el paciente. Consideramos una prioridad el principio de no maleficencia para con el paciente, por lo que se ha diseñado el protocolo de manera que el paciente no deba desplazarse a un centro hospitalario en más ocasiones de las programadas habitualmente en su seguimiento.

Las limitaciones que encontramos en nuestro estudio es que, debido a limitaciones puramente económicas y de acceso a la tecnología necesaria, solo se realizará el estudio de mutaciones concretas en los genes KRAS y BRAF, que ya se analizan de forma rutinaria en nuestro hospital en pacientes con cáncer colorrectal metastásico. En el futuro, en función de los resultados obtenidos en este proyecto, se planteará la aplicación de tecnologías de secuenciación masiva (NGS) para realizar el estudio de paneles multi-gen en cada paciente a estudio, al inicio de su seguimiento (al diagnóstico), en las muestras

de biopsia de tejido de tumor primario o, en su defecto, en biopsia líquida. De esta manera, se podrá identificar las mutaciones con mayor expresión en el tumor del paciente y analizar el número de copias de estas en concreto durante su seguimiento y así aumentar la sensibilidad de la técnica.

Además, debemos indicar que, como limitación, se ha descrito en la bibliografía consultada que una parte de los pacientes con cáncer como el colorrectal no presentan niveles de ctDNA detectables, por lo que en estos pacientes no sirve este biomarcador como factor pronóstico (4). Para ello, en futuros proyectos lo ideal sería, tras realizar el estudio mediante secuenciación masiva y, en su caso, comprobar que el paciente no presenta ninguna mutación oncogénica sobre-expresada en plasma, excluir estos pacientes del estudio y asumirlo como una limitación intrínseca de la técnica.

■ PLAN DE TRABAJO

Dada la disponibilidad del material y las instalaciones necesarias para el desarrollo del proyecto, consideramos que éste podría ser realizado en un plazo de cuatro años, de acuerdo al siguiente plan de trabajo:

MDLA: María Dolores López Abellán

PCZ: Pablo Conesa Zamora

GLG: Ginés Luengo Gil

ERB: Edith Rodríguez Braun

SOM: Servicio de Oncología Médica

SAP: Servicio de Anatomía Patológica

- Organización por años

Primer año:

- Elaboración del protocolo de recogida de muestras de pacientes con cáncer de colon estadio II y III, en colaboración con el Servicio de Oncología Médica y de Anatomía Patológica (MDLA, PCZ, ERC, SAP).
- Presentación del proyecto de investigación al Comité de Ética del Hospital General Universitario Santa Lucía (MDLA, PCZ).
- Recogida prospectiva de muestras de plasma y del consentimiento informado de los pacientes incluidos en el estudio (MDLA, ERB, SAP, GLG).
- Procesamiento y congelación de las muestras (SAP, GLG).
- Elaboración de la base de datos clínica (MDLA).

Segundo año:

- Análisis molecular de las muestras de plasma (MDLA).
- Actualización del seguimiento clínico de los pacientes (registro de recidiva, progresión y exitus) y completar la base de datos clínica (MDLA).

Tercer año:

- Actualización del seguimiento clínico de los pacientes (registro de recidiva, progresión y exitus) y completar la base de datos clínica (MDLA).

Cuarto año:

- Análisis estadístico de la correlación de los resultados obtenidos en ctDNA con parámetros de supervivencia y progresión (OS, DFS, RFS) (MDLA, PCZ).
- Comparación de los resultados obtenidos en ctDNA y marcadores tumorales (MDLA, PCZ).
- Escritura y comunicación de resultados (MDLA, PCZ, GLG).

- Cronograma de actividades

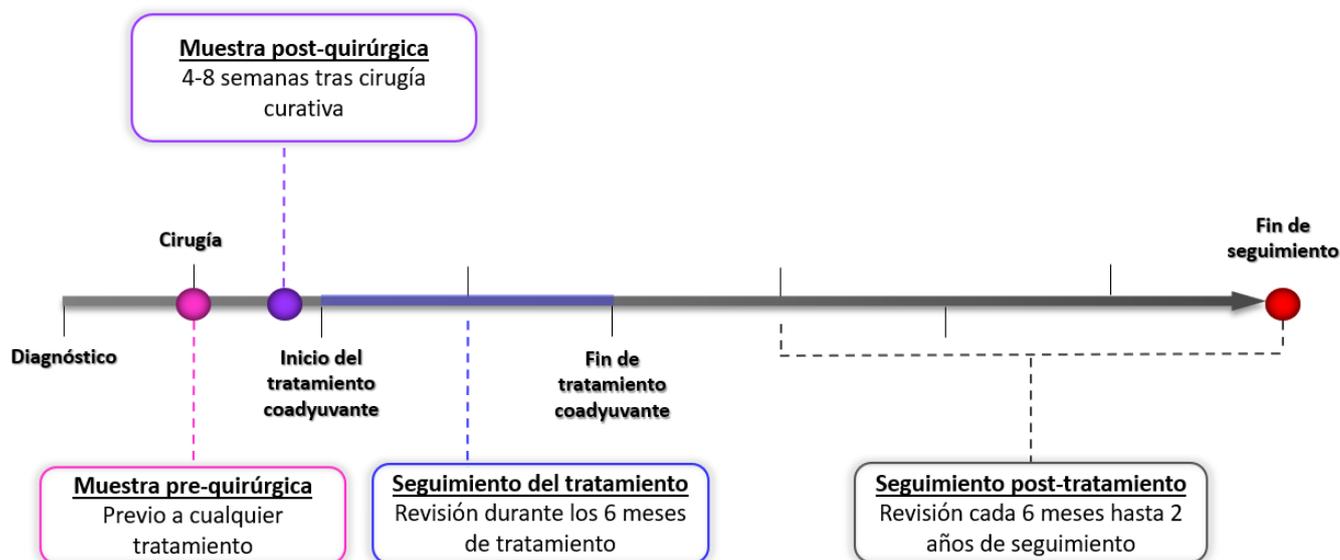


Ilustración 1. Esquema de recogida de muestras y realización de seguimiento de pacientes con cáncer colorrectal estadio II y III incluidos en el estudio sometidos a cirugía curativa. De estos pacientes, algunos reciben quimioterapia coadyuvante tras la cirugía y otros solo son sometidos a cirugía curativa.

ACTIVIDADES	AÑOS			
	1	2	3	4
1. Elaboración del protocolo de recogida de muestras	█	█		
2. Presentación del proyecto al Comité de Ética	█	█		
3. Recogida de muestras	█	█		
4. Elaboración de la base de datos clínica	█	█		
5. Análisis molecular de las muestras		█	█	
6. Seguimiento clínico de los pacientes		█	█	
7. Análisis estadístico de los resultados				█
8. Escritura y comunicación de resultados				█

Ilustración 2. Cronograma de actividades

■ ASPECTOS ÉTICOS

Este proyecto ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital General Universitario Santa Lucía con fecha del 15/01/2022. Con la excepción de aquellas situaciones de emergencia, no se permitirán cambios o

desviaciones del protocolo sin la aprobación documentada. El CEIC será informado de los posibles cambios y aprobará por escrito cualquier cambio o desviación que pueda afectar adversamente los derechos del voluntario o la validez de la investigación.

La realización de este estudio se ajustará a lo establecido en la legislación española (Ley de Investigación Biomédica 14/2007) y respetará en todo momento las normas de Buenas Prácticas Clínicas y la normativa y recomendaciones que figuran en la Declaración de Helsinki y que están recogidas en la legislación vigente sobre la práctica de estudios con pacientes y el tratamiento de muestras biológicas.

El material genético se almacenará, previo acuerdo de depósito, en el nodo del Biobanco en red de la Comunidad Autónoma de Murcia que corresponde al Hospital Santa Lucía.

Durante todo el transcurso del proyecto, se garantizará la confidencialidad de los datos, de acuerdo a la Ley orgánica 15/1999 de protección de datos de carácter personal incluyendo los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición de los datos.

Por supuesto, se solicitará el consentimiento a los pacientes para su inclusión en el estudio, que incluirá el consentimiento de la inclusión en el estudio y el de donación de muestra biológica (sangre).

Los investigadores se comprometen a la publicación de los datos del estudio.

■ APLICABILIDAD Y UTILIDAD DE RESULTADOS

Cada vez son más las evidencias que demuestran que el estudio de las mutaciones en el ctDNA tienen utilidad en el seguimiento del paciente oncológico, ya que aporta información sobre el riesgo de recaída y de resistencia tumoral al tratamiento evitando la realización de una nueva biopsia.

En cuanto a la utilidad del ctDNA en cáncer colorrectal, se ha demostrado que aporta información pronóstica y predictiva relevante en diferentes fases de la progresión de la enfermedad. En concreto, con el presente proyecto queremos evaluar el valor pronóstico de la detección y cuantificación de ctDNA postquirúrgico en nuestra propia cohorte de pacientes con cáncer colorrectal estadio II y III. De esta manera, estudiaremos el valor del ctDNA para detectar la enfermedad mínima residual, esto es, la detección de una

elevación del biomarcador sin evidencia clínica o radiológica de recurrencia tras las terapias potencialmente curativas, y su utilidad para el estadiaje de los pacientes en función el riesgo de sufrir una recaída o la muerte en la evolución de su enfermedad.

■ EXPERIENCIA DEL EQUIPO INVESTIGADOR

Pablo Conesa Zamora, investigador principal del equipo, es licenciado en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid y es doctor en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad de Murcia desde 2007. Además, como parte de su formación, ha completado varios másters, entre los que se encuentra el Máster en Oncología Molecular por el Centro Nacional de Investigación Oncológicas (CNIO). Actualmente desempeña labores asistenciales y de investigación como facultativo especialista en Análisis Clínicos en el Hospital General Universitario Santa Lucía.

Cuenta con 67 publicaciones científicas, la mayoría de ellas como primer autor en revistas Q1 y Q2 de diversas áreas, como Oncología, Patología y Farmacología, con más de 1000 citaciones.

Ha participado en proyectos de investigación de alto presupuesto, entre los que se encuentran el proyecto europeo *targeted therapy for advanced colorectal cancer patients* (REVERT) Comisión Europea Horizonte 2020, con un presupuesto de 5.887.273,75 € y el ensayo clínico *Historical and clinical effects of imipramine in the treatment of patients with fascin1-overexpressing tumors* (ref: ICI20/00044), financiado por el Instituto de Salud Carlos III.

Ginés Luengo Gil es licenciado en Biología por la Universidad de Murcia y doctor en Hematología y Oncología Clínico-Experimental por la misma universidad desde 2016. Además, realizó el Máster en Biología Molecular y Biotecnología de esta universidad. Cuenta con numerosas horas de docencia en el Grado de Medicina, el Máster de Bioinformática y el Grado de Fisioterapia de la Universidad de Murcia y ha dirigido varias tesis sobre Biología Molecular y Hematología. Actualmente desempeña el puesto de investigador doctor en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital General Universitario Santa Lucía y como profesor asociado de Bioquímica y Biología Molecular en la Universidad de Murcia.

Ha publicado 48 artículos, la mayoría en revistas de alto impacto. Ha participado y participa actualmente en diversos proyectos de investigación, entre los que se encuentran el estudio del RNA no codificante (ncRNA) como biomarcador de riesgo en la trombosis asociada al cáncer de colon metastásico, realizado en el Hospital General Universitario Santa Lucía financiado por la Sociedad Española de Trombosis y Hemostasia y el proyecto REVERT.

■ PRESUPUESTO

- Gastos de personal

No se contratará personal específico para este proyecto. El personal participante está actualmente contratado por el Servicio Nacional de Salud.

- Gastos de ejecución

Los gastos de ejecución (adquisición de bienes inventariables, material fungible y contratación de servicios) se obtendrán del proyecto REVERT (taRgeted thErapy for adVanced colorEctal canceR paTients), financiado con fondos europeos, en el que participa el Grupo de Investigación.

El cálculo aproximado del coste por prueba mediante la técnica PCR digital según la metodología descrita es de 15 euros. Puesto que a cada paciente se le determinará el *status* mutacional para *KRAS* y *BRAF* en dos ocasiones, al diagnóstico y 4-8 semanas post-cirugía, y dado que la población a estudio estimada es de 54 pacientes, estimamos el coste aproximado total del estudio en 1620 euros, en términos de gastos de ejecución.

3. Bibliografía

1. Pascual J, Attard G, Bidard F, Curigliano G, Diehn M, Italiano A, et al. SPECIAL ARTICLE ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer : a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol* [Internet]. 2022;xxx(xxx). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.05.520>
2. Remon J, García-Campelo R, de Álava E, Vera R, Rodríguez-Peralto JL, Rodríguez-Lescure, et al. Liquid biopsy in oncology: a consensus statement of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology. *Clin Transl Oncol*. 2020;22(6):823–34.
3. Normanno N, Cervantes A, Ciardiello F, De Luca A, Pinto C. The liquid biopsy in the management of colorectal cancer patients: Current applications and future scenarios. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2018;70:1–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.07.007>
4. Dasari A, Morris VK, Allegra CJ, Atreya C, Benson AB, Boland P, et al. ctDNA applications and integration in colorectal cancer: an NCI Colon and Rectal–Anal Task Forces whitepaper. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17(12):757–70.
5. Vidal J, Muinelo L, Dalmases A, Jones F, Edelstein D, Iglesias M, et al. Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol*. 2017;28(6):1325–32.
6. Merk C, Martling A, Lindberg J, Benhaim L, Taieb J, Lind P. Circulating tumor DNA (ctDNA) in adjuvant therapy of early stage colon cancer: current status and future perspectives. *Acta Oncol (Madr)* [Internet]. 2022;61(4):523–30. Available from: <https://doi.org/10.1080/0284186X.2022.2033831>
7. Tie J, Cohen JD, Lahouel K, Lo SN, Wang Y, Kosmider S, et al. Circulating Tumor DNA Analysis Guiding Adjuvant Therapy in Stage II Colon Cancer. *N Engl J Med*. 2022;386(24):2261–72.
8. Tie J, Cohen JD, Gibbs P. Circulating Tumor DNA Analyses as Markers of Recurrence Risk and Benefit of Adjuvant Therapy for Stage III Colon Cancer. *JAMA Oncol*. 2019;5(12):1710–7.

9. Li Y, Mo S, Zhang L, Ma X, Hu X, Huang D, et al. Postoperative circulating tumor DNA combined with consensus molecular subtypes can better predict outcomes in stage III colon cancers: A prospective cohort study. *Eur J Cancer* [Internet]. 2022;169:198–209. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2022.04.010>
10. Anandappa G, Starling N, Peckitt C, Bryant A, Begum R, Carter P, et al. TRACC: Tracking mutations in cell-free DNA to predict relapse in early colorectal cancer— A randomized study of circulating tumour DNA (ctDNA) guided adjuvant chemotherapy versus standard of care chemotherapy after curative surgery in patients with high ri. *J Clin Oncol*. 2020;38(15):Supplement.
11. Chakrabarti S, Xie H, Urrutia R, Mahipal A. The promise of circulating tumor DNA (ctDNA) in the management of early-stage colon cancer: A critical review. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10):1–18.
12. Schraa SJ, Van Rooijen KL, Van Der Kruijssen DEW, Rubio Alarcón C, Phallen J, Sausen M, et al. Circulating tumor DNA guided adjuvant chemotherapy in stage II colon cancer (MEDOCC-CrEATE): Study protocol for a trial within a cohort study. *BMC Cancer*. 2020;20(1):1–10.
13. Mi J. Circulation tumour DNA in predicting recurrence and prognosis in operable colorectal cancer patients : A metaanalysis. *Eur J Cancer Investig*. 2022;e13842. *Ad(July)*:1–11.

4. Anexos

ANEXO 1. Documento de consentimiento informado

  <p>Hospital General Universitario Santa Lucía</p>	<p style="text-align: center;">ETIQUETA IDENTIFICATIVA</p> <p>Nº Hª.: Nº S.S.: 1º APELLIDO: 2º APELLIDO: Sexo: NOMBRE: Edad: Dirección: Teléfono: Fecha de nacimiento:</p>	
<p>SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA</p>		
<p>AUTORIZACIÓN PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA ESTUDIOS GENÉTICOS Y DE INVESTIGACIÓN</p>		
<p>Yo, D./D^a, como paciente o como representante de D....., en pleno uso de mis facultades, libre y voluntariamente DECLARO QUE HE SIDO INFORMADO Y HE COMPRENDIDO ADECUADAMENTE la información que me ha sido facilitada por los Dr./a/es., en virtud de los derechos que marca la LEY DE AUTONOMÍA DEL PACIENTE, CONSIENTO en DONAR al BANCO DE MUESTRAS DEL Hospital SANTA LUCÍA, la MUESTRA BIOLÓGICA (sangre) que voluntariamente accedo a donar, o excedentes de las que me han sido extraídas o puedan serlo durante el manejo de mi enfermedad, o las que se precisen para mi participación en el Estudio de Investigación CIRCOLA, y ello a los efectos de que las mismas puedan ser utilizadas en ESTUDIOS GENÉTICOS Y DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA dentro de la línea de investigación en la que trabajan los referidos Dres. Pablo Conesa Zamora y Edith Rodríguez Braun y que tiene por objeto la monitorización de mi enfermedad a través del estudio de ADN libre circulante en sangre. He tenido la oportunidad de aclarar mis dudas al respecto de esta DONACIÓN en entrevista personal con el Dr/Dra. Estoy satisfecho/a con la información que se me ha proporcionado y entiendo que este Consentimiento puede ser REVOCADO en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, y sin que eso pueda repercutir bajo ningún concepto en la asistencia sanitaria que deba recibir. Se me entrega copia de este documento. Para que así conste, firmo el presente documento después de leído en Cartagena, de de 20.....</p>		
Firma del paciente	Firma del representante legal	Firma del doctor que informa
D.N.I.:	D.N.I.:	Nº colegiado
<p>Autorizo el uso de posibles excedentes de mis muestras una vez utilizadas y concluida la investigación para que puedan ser usados en otros proyectos y líneas de investigación relacionados incluidos los realizados por terceros investigadores: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/></p>		
<p>En el caso de que en el curso de las investigaciones que se realicen se descubran datos que puedan ser relevantes para mi salud o la de mi familia QUIERO SER INFORMADO <input type="checkbox"/> NO QUIERO SER INFORMADO <input type="checkbox"/></p>		
<p>Si desea anular su consentimiento o si desea ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, deberá solicitarlo por escrito al Dr/Dra _____ Servicio de _____ Hospital General Universitario Santa Lucía. Calle Minarete, s/n, 30202 Cartagena. Teléfono: 968 12 86 00 ext. 951423</p>		
<p>Sólo en caso de revocación del consentimiento</p>		

D./D ^a con DNI. REVOCO el consentimiento previamente otorgado para que mis muestras biológicas sean conservadas y destinadas a la investigación biomédica y deseo que las mismas sean destruidas / anonimizadas (tache lo que no sea correcto). Firma	
Cartagena, ade De 20	
Información al dorso	20/04/22

ANEXO I. HOJA DE INFORMACIÓN AL DONANTE

ESTUDIO CIRCOLA: “ESTUDIO DNA CIRCULANTE EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL ESTADIO II Y III EN TRATAMIENTO ADYUVANTE”.

En el Servicio de Anatomía Patológica centro **Hospital General Universitario Santa Lucía** se está realizando un estudio en el que se le invita a participar después de que haya leído la información que se le facilita en estas páginas, y haya consultado y aclarado todas las dudas. Pregunte a su médico cualquier duda, y solicítele cualquier aclaración que considere necesaria, para que pueda decidir de forma libre y con la información necesaria, si quiere o no participar en este estudio. Este estudio es promovido por los propios investigadores del centro.

Cada vez son más las evidencias que demuestran que el estudio de las mutaciones en el ADN circulante tumoral (ctDNA) en una muestra de sangre tiene utilidad en el seguimiento del paciente oncológico, ya que aporta información sobre el riesgo de recaída y de resistencia tumoral al tratamiento evitando la realización de una nueva biopsia.

El proyecto de estudio para el que solicitamos su participación tiene como **objetivo** El objetivo principal del estudio es evaluar el valor pronóstico de la determinación de ctDNA en diferentes momentos de la enfermedad del paciente para ayudar al manejo de pacientes con cáncer colorrectal estadio II y III que reciben tratamiento adyuvante.

La participación en este estudio implica la **donación de dos tubos de sangre**, para lo que se le solicita autorización en un documento adicional de consentimiento. El material biológico obtenido a partir de ella se conservará en el Laboratorio del S^o de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Santa Lucía (Cartagena). No se prevé que tenga usted complicaciones asociadas a este procedimiento, más allá de aquellas derivadas de la toma de la muestra que le será realizada. Los datos que se recogerán asociados a su historia clínica serán exclusivamente los relativos a enfermedades infecciosas y con el fin de prevenir posibles contagios del personal que trabajará con sus células. El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes, se rige por lo dispuesto en el Reglamento General de Protección de Datos (UE) 2016/679, de 27 de abril de 2016, del Parlamento Europeo y del Consejo; la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales y la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica. El Promotor del presente estudio es el Servicio Murciano de Salud. Tanto el Centro como el Promotor son responsables respectivamente del tratamiento de sus datos y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos en vigor. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código, de manera que no se incluya información que pueda

identificarle, y solo el investigador principal del estudio y colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted. Por tanto, su identidad no será revelada a ninguna otra persona salvo a las autoridades sanitarias o judiciales cuando así lo requieran, o en caso de urgencia médica. Los Comités de Ética de la Investigación, los representantes de la Autoridad Sanitaria en materia de inspección y el personal autorizado por el Promotor, únicamente podrán acceder para comprobar los procedimientos del estudio y el cumplimiento de las normas de buena práctica clínica y ello, quedando siempre los mismos obligados al mantenimiento de la confidencialidad de la información. El acceso a su historia clínica será solo a efectos de cumplir con los fines del estudio.

Sólo se remitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio, que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre y apellidos, iniciales, dirección, etc. Si realizáramos transferencia de sus datos codificados fuera de la UE a las entidades de nuestro grupo, a prestadores de servicios o a investigadores científicos que colaboren con nosotros, los datos de los participantes quedarán protegidos con salvaguardas tales como contratos u otros mecanismos por las autoridades de protección de datos.

Si desea más información al respecto puede contactar con el Delegado de Protección de Datos (IMIB-Arrixaca/FFIS, Pabellón Docente del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca - 3ª Planta C/ Campo 12, 30120 - El Palmar – Murcia Telf: 968-359767, Apartado de correos: 77 - Murcia)

Usted, además de ejercer los derechos de acceso, rectificación, oposición y cancelación, también puede limitar el tratamiento de datos que sean incorrectos, solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad) los datos que usted ha facilitado para el estudio. Para ejercitar estos derechos, diríjase al investigador principal del estudio (o al delegado/a de Protección de Datos de Servicio Murciano de Salud (dpd-sms@carm.es) o al Delegado de Protección de Datos del Promotor). Le recordamos que los datos no se pueden eliminar, aunque deje de participar en el estudio para garantizar la validez de la investigación y cumplir con los deberes legales. Así mismo, tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no quedara satisfecho. El Investigador y el Promotor están obligados a conservar los datos recogidos para el estudio al menos hasta 25 años tras su finalización. Posteriormente, su información personal solo se conservará por el centro para el cuidado de su salud y por el promotor para otros fines de investigación científica si usted hubiera otorgado su consentimiento para ello y así lo permite la ley y requisitos éticos aplicables.

La información obtenida en el estudio que pueda ser relevante para su salud de forma individual, podrá serle comunicada si usted lo desea. También sus familiares podrán ser informados si la información obtenida fuera relevante para ellos y si usted lo considera conveniente. Así mismo, y también si lo desea, una vez finalizado el estudio puede recibir información global sobre sus resultados. En ningún caso se comunicarán datos a terceros sin su consentimiento.

Su participación en este proyecto de investigación es voluntaria y tiene usted derecho a revocar su consentimiento en el momento que lo desee, sin dar explicaciones. No se contempla la remuneración por su participación en este estudio dado que no son esperables beneficios económicos del mismo.

Mediante la firma de este consentimiento, accede voluntariamente a participar en este proyecto de investigación y reconoce que sus dudas sobre el mismo han podido ser convenientemente explicadas por el responsable del proyecto (Dr. Pablo Conesa Zamoral). Si lo necesita, también puede contactar con los investigadores en el Hospital Santa Lucía de Cartagena (teléfono 968 12 86 00, ext. 951615).

Riesgos típicos de la donación de muestras para investigación: La donación de estas muestras es totalmente altruista y no supone ningún riesgo especial añadido para su salud, ni entraña ninguna consecuencia relevante o de importancia adicional.

Riesgos personalizados: No existe la posibilidad de que concurren circunstancias individuales que puedan incrementar el riesgo para la persona que otorga este consentimiento.

Contraindicaciones: No existe ninguna contraindicación para la conservación de muestras biológicas.

Alternativas al procedimiento: En el caso de que no de su conformidad para la inclusión de la muestra el banco de tejidos, o para la conservación de otras muestras biológicas, el material será destruido y eliminado.

NOTA IMPORTANTE: Dentro del proyecto de investigación, si el investigador que le atiende lo considera indicado, podría ser necesario obtener nuevas muestras. En estos casos se le informará de la nueva donación, pero no se le presentará un nuevo documento de petición de autorización para la inclusión de las nuevas muestras biológicas para estudios genéticos y de investigación. No obstante, usted puede revocar en cualquier momento el consentimiento que ahora

