

Estudio prospectivos de medición y caracterización del ctDNA mediante biopsia líquida en pacientes con cáncer de mama avanzado para determinar la utilidad clínica de la biopsia líquida

INVESTIGADOR/A PRINCIPAL: VALENTINA BONI/EVA CIRUELOS

RESUMEN (Objetivos y Metodología del Proyecto)

El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en la mujer española y supone un 29% de todos los cánceres. Se calcula que 1 de cada 8 mujeres españolas tendrá un cáncer de mama en algún momento de su vida.

Aunque la mortalidad por cáncer de mama ha descendido en los últimos años gracias a los programas de cribado y a la mejora de los tratamientos el cáncer de mama sigue siendo la primera causa de muerte por cáncer en España en las mujeres.

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea con diferentes subtipos biológicos, moleculares y clínicos (1). El desarrollo de marcadores pronósticos y predictivos representa un reto importante para mejorar el manejo de esta enfermedad ya que la identificación de estos factores puede ser una valiosa herramienta para diseñar un plano terapéutico adaptado a cada paciente y a cada situación particular y así evitar sobre o infra tratamiento (2).

En este sentido se han desarrollado diferentes plataformas moleculares que se basan sobre el análisis de expresión génica de la muestra tumoral del primario (MammaPrint®, Oncotype DX™, EndoPredict® y Prosigna™) y que permiten elaborar un riesgo de recurrencia local y/o a distancia con el objetivo de personalizar el tratamiento posterior a la cirugía en cada paciente a favor de terapia hormonal en pacientes de bajo riesgo o a favor de quimioterapia en pacientes de alto riesgo (3-7).

Más recientemente se ha reconocido el valor de la biopsia líquida como nueva técnica para identificar biomarcadores del tumor de forma más rápida y menos invasiva. Se trata de analizar un biomarcador como ADN tumoral circulante libre, de células tumorales circulantes y/o de exosomas aislado de cualquier líquido corporal (por ejemplo sangre, saliva, líquido pleural, ascítico u orina). El análisis del ADN tumoral circulante libre (ctADN) se refiere al estudio de ADN vertido específicamente por las células tumorales en la circulación proveniente del tumor primario así como de las metástasis (8,9).

Su cuantificación se ha asociado de manera proporcional con la carga tumoral así como la caracterización genómica del ctADN mediante técnicas de secuenciación masiva ha permitido la identificación de mutaciones claves para personalizar el tratamiento y/o para identificar mecanismos de resistencia al mismo (10).

Este nuevo método no invasivo nos permite un estudio del cáncer del paciente con una mayor facilidad de obtención y de cantidad de muestra, análisis genómico tumoral más representativo de la heterogeneidad tumoral entre tumor primario y metástasis tanto espacial que temporal así como el seguimiento durante la enfermedad para monitorización de la carga tumoral, detección precoz de recaída, detección de enfermedad mínima residual, monitorización de respuesta a tratamiento e identificación de mecanismos de resistencias al mismo (11).

El estudio del ctDNA tiene el potencial de caracterizar las mutaciones del cáncer de mama y de monitorizar longitudinalmente estas alteraciones genómicas a lo largo de la historia de la enfermedad.

En pacientes con cáncer de mama no metastásico mediante ctDNA se pueden captar y monitorizar los marcadores genómicos de la enfermedad mínima residual después de la resección curativa, posiblemente precediendo al desarrollo de recurrencia clínica o radiológica y proporcionando una herramienta para evaluar la latencia tumoral (12,13).

Este concepto ha sido recientemente validado en un estudio prospectivo en el cual el ctDNA se detectó antes de la recaída en el 95.6% de los paciente que presentaban recaída extra craneal. El subtipo triple negativo se asociaba con niveles de ctDNA más elevados al diagnóstico y más alto valores de ctDNA se asociaban en manera significativa con el riesgo de recaída (14). Basándose sobre estos hallazgos actualmente se ha puesto en marcha un estudio clínico de fase 2 en el cual las pacientes con recaída molecular inician tratamiento sistémico sin esperar la recurrencia radiográfica ni sintomática de la enfermedad con el objetivo de evaluar la utilidad clínica y la posibilidad de mejorar la supervivencia global tratando estas pacientes de forma más precoz.

Otro punto clave es que mediante el análisis molecular del ctDNA se pueda detectar alteraciones genómicas accionables que puedan guiar el proceso de toma de decisiones en la clínica. La medicina de precisión se basa en el análisis genómica del tumor de cada paciente para individualizar el tratamiento de forma específica sobre la base de alteraciones moleculares que sean accionables mediante tratamiento dirigido. En los programas actuales de medicina de precisión la biopsia de la lesión metastasica es necesaria para el estudio de secuenciación y así detectar alteraciones genómicas accionables. Estudios de comparación han mostrado una buena correlación entre las alteraciones genéticas en muestras pareadas de tejido y de ctADN confirmando su utilidad como herramienta de diagnóstico (15). Esto permite que un mayor número de pacientes de cáncer de mama avanzado sin lesiones metastasicas accesibles puedan tener la posibilidad de un perfil molecular de su enfermedad y eventualmente acceso a terapias personalizadas. Adicionalmente, en el contexto de ensayos clínicos de fase temprana que usan terapias dirigidas, la alteraciones genómicas derivadas de tumores se han evaluado mediante muestras seriadas de ctADN, demostrando la utilidad de monitorizar el ctDNA a lo largo del tratamiento como marcador de respuesta al mismo.

En este estudio proponemos llevar a cabo el análisis molecular mediante biopsia líquida en pacientes con cáncer de mama avanzado para el descubrimiento sistemático de factores moleculares de sensibilidad y resistencia a sustancias antitumorales así como para monitorización de la enfermedad a lo largo de su historia natural. El uso de la biopsia líquida nos permitirá evaluar la utilidad clínica de esta técnica mínimamente invasiva para la determinación de alteraciones genéticas potencialmente accionables y que puedan guiar la decisión terapéutica de forma personalizada así como la monitorización de la enfermedad a lo largo del tratamiento.

HIPÓTESIS

El presente estudio tiene como objetivo cuantificar y caracterizar molecularmente el ctDNA mediante biopsia líquida para demostrar el papel del ctDNA como biomarcador de utilidad clínica en pacientes con carcinoma de mama avanzado candidato a recibir tratamiento por su enfermedad oncológica.

El estudio molecular del ctDNA en biopsia líquida es una herramienta mínimamente invasiva que nos permitirá detectar mutaciones accionables para la individualización del tratamiento, monitorizar la respuesta de la enfermedad al tratamiento así como los mecanismos de resistencia a fármacos.

Cuantificación y caracterización del ctDNA en el plasma de pacientes con cáncer de mama avanzado.

En el caso de cáncer de mama avanzado se utilizará el Gurdant360 para estudio de mutaciones accionables y su seguimiento a diferentes time points (Baseline, después del 1 ciclo de tto y a la progresión) a lo largo del tratamiento para monitorización de la respuesta y de mecanismos de resistencia a fármacos.

OBJETIVOS

Objetivo primario

-Determinar el número de paciente en las cuales se identifica mediante biopsia líquida y caracterización del ctDNA mutaciones potencialmente accionables que vendrán clasificadas usando la escala de clasificación ESMO (ESCAT)

-Determinar el descenso del ctDNA durante el 1 ciclo de tratamiento y validar su valor como biomarcador predictivo de respuesta precoz durante el mismo.

Objetivo secundario

Identificar mediante el empleo sistemático de tres plataformas “ómicas” (Next Generation Sequencing [OncoPrint Comprehensive assay v3.0 Ion Torrent Technologies ThermoFisher] para estudio del exoma, Infinium Methylation EPIC bead chip para el estudio del metiloma (en sangre y en tumor) y los paneles Pancancer de Prosigna® mediante Nanostring Inc para estudios de expresión de RNA) y el análisis bioinformático integrativo correspondiente, alteraciones moleculares que estén presentes de forma diferente en casos respondedores y resistentes a fármacos antitumorales e inmunoterapia en cáncer.

Así como el estudio de variantes en línea germinal (polimorfismos/SNPs) asociados a toxicidad por fármacos antitumorales e inmunoterapia en cáncer mediante estudios de secuenciación del exoma (Next Generation Sequencing [Bioanalyzer 2100 (Agilent Technology)])

DISEÑO: estudio observacional prospectivo no-EPA para la identificación mediante biopsia líquida de factores moleculares pronósticos y predictivos en cáncer de mama avanzado, longitudinalmente a lo largo de la historia de la enfermedad.

Serán incluidos todas las pacientes de cáncer de mama de mama avanzado en progresión a tratamiento estándar y potencialmente candidato a nuevas terapias, atendidos en la unidad de Mama y de Fase I START Madrid CIOCC del Hospital Madrid Norte Sanchinarro. Se espera un reclutamiento de 40 casos/año, estando previstos dos años de reclutamiento.

El estudio consta de 3+/-1 puntos de extracción determinados para la obtención de las muestras longitudinales en el tiempo, que permitan evaluar la evolución de la enfermedad y la utilidad médica del ctDNA mediante biopsia líquida.

Estos puntos de extracción determinados para obtener la muestra de sangre para la evaluación del ctDNA coinciden con diferentes visitas de seguimiento a las que se somete un paciente con cáncer de mama avanzado candidato a tratamiento de su enfermedad oncológica:

- Antes de empezar el tratamiento
- En el segundo ciclo de tratamiento
- A la progresión al tratamiento
- En el caso de las pacientes en tratamiento con inmunoterapia se efectuará la determinación del ctDNA en el caso de sospecha de progresión y en el TAC de confirmación de la progresión según irRecist

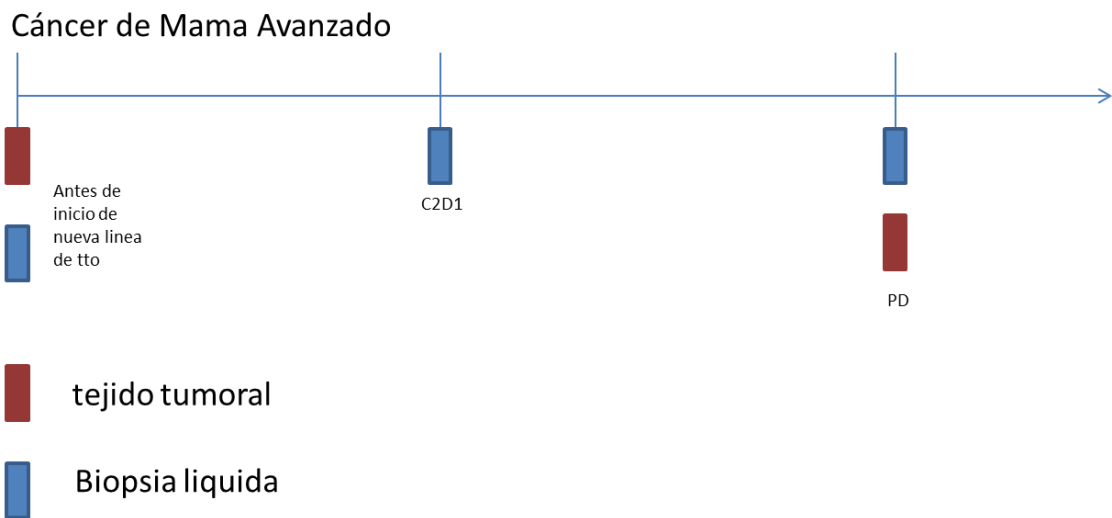


FIG. 1 Esquema del estudio. Recogida de la muestra de tejido tumoral y mediante biopsia liquida durante el estudio

El presente estudio consta de 3 Etapas:

- 1) Recogida de datos y muestras. Las muestras de sangre en cada time point se recogerá según práctica clínica habitual en la Unidad START Madrid CIOCC. En esta fase se realizará una base de datos que contenga las características clínicas y moleculares de cada paciente. Además se obtendrá un biobanco de muestras de tumor y/o fluidos de cada paciente.
- 2) Análisis “omica”: en esta fase se obtendrán el estudio molecular de cuantificación y caracterización del ctDNA y se utilizarán diferentes estrategias moleculares y plataformas “ómicas” para determinar variables moleculares del tumor.
- 3) Análisis del impacto de dichas determinaciones y su utilidad clínica en el manejo de las pacientes con cáncer de mama.

Reclutamiento de pacientes

Pacientes con diagnóstico de cáncer de mama avanzado en progresión, antes del inicio de tratamiento y que se consideran candidatas a recibir una nueva línea terapéutica. Todos los pacientes incluidos firmarán consentimiento informado específico. Dichos pacientes se consideraran elegibles para el estudio si cumplen con los criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión

- Edad ≥ 18 años
- Firma de consentimiento informado
- Diagnóstico de cáncer de mama confirmado histológicamente
- Paciente diagnosticado de cáncer de mama localmente avanzado y/o metastasico candidato a recibir una nueva línea de tto para su enfermedad oncológica y antes del empieza de la misma.
- Posibilidad y voluntad de cumplir con los procedimientos del ensayo

Criterios de exclusión

- Expectativa de vida < a los 3 meses
- No disponibilidad del tejido tumoral correspondiente al diagnóstico y/o a la recaída metastasica
- Paciente con enfermedad grave o enfermedad psiquiátrica que impida el consentimiento informado y/o si los pacientes son incapaces de seguir los procedimientos del protocolo y dar su consentimiento informado
- Pacientes con riesgo derivado de la realización de una extracción de sangre

El estudio se llevará a cabo según los principios de experimentación humana establecidos en la Declaración de Helsinki. En todos los casos, se obtendrá el consentimiento informado del paciente tras una entrevista personal donde se le informará verbalmente y por escrito de los potenciales riesgos de los procedimientos de ensayo.

Recogida de datos clínicos

Los datos clínicos de la cohorte prospectiva se recogerán mediante un CRD electrónico, que será diseñado por la investigadora principal (IP) del estudio (Dra Valentina Boni). Se creará una base de datos anonimizada con un código propio del estudio, en la que se recogerán las siguientes variables clínicas: Edad, Diagnóstico oncológico (incluyendo histología, breve descripción del fenotipo y estadio), Tratamiento recibido y respuesta a

tratamiento previos, tipo de tratamiento, Respuesta obtenida con dicho tratamiento, carga tumoral, tiempo libre de progresión y supervivencia global.

La base de datos se registrará en la Agencia Española de Protección de datos, de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos.

La evaluación de la eficacia se efectuará en base a los criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos, tales como respuesta completa, respuesta parcial, no cambio o tiempo hasta progresión de la enfermedad serán las principales variables dependientes del estudio y se evaluarán según el RECIST y irRECIST. Se realizarán las pruebas de imágenes según práctica clínica habitual (antes de recibir el tratamiento y se repetirá cada 6-8 semanas) y/o cuando considerado clínicamente necesario. La tasa de respuestas objetivas y la duración de la respuesta, limitada a aquellos pacientes con enfermedad medible, se realizará de acuerdo a los criterios WHO. El tiempo hasta la progresión se controlará desde el momento de la cirugía y/ o administración de los fármacos hasta el progresión de la enfermedad. El tiempo de supervivencia global se calculará desde el diagnóstico de cáncer hasta la muerte.

1) Muestras de sangre:

Después de obtener el consentimiento informado, se obtendrán muestras de sangre de los pacientes antes de comenzar tratamiento (muestra basal), antes del segundo ciclo de tto en el caso de cáncer de mama metastasico y a la progresión de la enfermedad.

Se aprovecharán las extracciones sanguíneas de control de la enfermedad y del tratamiento para obtener un volumen sanguíneo adicional (50ml) para el análisis del ctDNA.

Se recogerán 50 mL de sangre periférica de cada paciente en cuatro tubos: tres de EDTA, K2-EDTA o heparina y uno para extracción de ARN. La muestras serán procesadas entre 2 horas de la recogida mediante doble centrifugación de la sangre, la primera durante 10 minutos a 1000g, el plasma será separada y nuevamente centrifugado durante 10 minutos a 2000 g y conservado a -80°C .

La sangre se utilizará para estudio de ctDNA mediante secuenciación masiva y estudio de metilación, inmunofenotipado y genotipado de HLA y determinación de biomarcadores solubles. También para la extracción de ARN y análisis de las muestras mediante la plataforma nanostring con la tecnología nCounter.

En los casos en que se prevea emplear inmunoterapia, se realizará el inmunofenotipado de las muestras de sangre. Se determinará para ello la proporción de diferentes poblaciones de linfocitos y los niveles de expresión de los marcadores de coestimulación de las células T en preparados de sangre periférica mediante citometría de flujo. Los análisis pueden incluir, pero no estar limitados a, las proporciones de células T, B y células NK, proporción de células T efectoras y de memoria y los niveles de expresión de PD-1, PD-L1, PD-L2, ICOS, y Ki67. Además se tratará de cuantificar las células MDSC antes y después del tratamiento. También se solicitará el genotipado de los HLA mediante técnicas de laboratorio estándar. Los biomarcadores solubles, como citoquinas, receptores solubles y antígenos de tumor se caracterizarán y se cuantificarán en suero. Los análisis incluirán, pero no estarán limitados a, CD25 soluble, PD-1 soluble, LAG-3 soluble y CXCL-9. Las muestras de suero también se pueden utilizar para la determinación de las respuestas específicas de antígeno del tumor y explorar así cuales son los anticuerpos antitumorales más asociados a la respuesta clínica. Los niveles de anticuerpos se determinarán mediante ensayos de multiplexing y ELISAs.

2) Muestras de tumor

Las muestras de tumor corresponderán a muestras de archivo o bien de biopsias recogidas a la progresión del paciente (siempre y cuando sean realizadas como parte de la

práctica asistencial o hayan sido exigidas por el correspondiente ensayo clínico, generándose un remanente de tejido).

Las muestras de tumor (parafinadas o frescas) se cortarán en secciones de 2-4 um para su tinción con eosina y hematoxilina que permitirán la identificación de la zona tumoral y no tumoral dentro del bloque. Las demás secciones se utilizarán para teñir mediante inmunohistoquímica para diferentes anticuerpos. En los casos en que se prevea utilizar inmunoterapia también determinaremos la presencia y composición de subpoblaciones de TILs (linfocitos infiltrantes de tumor), empleando marcadores de células T y marcadores de macrófagos.

Dos patólogos independientes analizarán las muestras así procesadas y las discrepancias se solucionarán mediante discusión entre ambos.

En todos los casos se realizará un proceso de doble disociación que garantice que la muestra continúe anónima. De esta forma los investigadores básicos no conocerán los resultados clínicos y se garantizará la objetividad del estudio y el anonimato de los casos.

Se aislará ADN de las zonas tumoral y no tumoral identificados para realizar la evaluación de mutaciones somáticas, neoepítomos y metilaciones. El ADN se procesará de forma similar a la descrita en el apartado anterior utilizando los kits de extracción adecuados para muestras parafinadas o para congeladas según proceda.

Identificación de variantes genéticas germinales asociadas a la respuesta por inmunoterapia.

Metiloma

Los estudios de metilación se llevarán a cabo con el Infinium Methylation EPIC bead chip que interroga más de 850.000 CpGs y proporciona una cobertura inigualable de islas CpG, genes refseq, cromatina abierta (ENCODE), sitios de unión de factores de transcripción (ENCODE) y potenciador FANTOM5. Los resultados son un "pan-enhacer" y regiones codificantes del metiloma que puede ser utilizado para los EWAS (epigenome wide associations studies (EWAS)). En los casos que reciban inmunoterapia se compararán los niveles de los patrones de metilación entre linfocitos T infiltrantes y periféricos y del DNA tumoral y circulante.

Análisis del transcriptoma

El ARN aislado del tumor y la sangre periférica se analizará utilizando el GX Human Immunology V2 y Pancancer, ambos Kits de Nanostring Inc para determinar después del análisis de los resultados cuales son los genes que se expresan. Esta tecnología ha sido elegida por su reproductibilidad, punto clave para una potencial implementación en la práctica asistencial.

Evaluación de mutaciones somáticas y neoepítomos

Para esta evaluación se utilizará el ADN aislado de zonas tumorales y del CtDNA en plasma analizado mediante Signatera en el caso de paciente con cáncer de mama precoz y con Guardant 360 en el caso de cáncer de mama avanzado.

EN las pacientes candidatas a tto de inmunoterapia se efectuará análisis específico de HLA y análisis de homología de epítomos.

Análisis de datos:

Los datos generados en este estudio serán analizados por los investigadores del estudio con el soporte del equipo de bioinformática. De forma resumida: En primer lugar se realizará un análisis descriptivo de la población del estudio. Se establecerán las frecuencias de distribución e intervalos de confianza al 95% de las variables cualitativas. Se determinarán medidas de tendencia central (media y mediana) así como de dispersión (desviación estándar y varianza) para variables cuantitativas. Se realizarán estudios de normalidad para toda variable cuantitativa.

En una segunda fase se realizará un análisis por subgrupos, comparando las variables en cada subpoblación con la población global del estudio y entre ellas. Se aplicará el test de la Chi-cuadrado para variables cualitativas, T de Student para las cuantitativas y análisis de la varianza (ANOVA) para variables cuantitativas con más de dos grupos. La correlación entre variables cuantitativas será determinada mediante el coeficiente de Pearson. En el caso de variables cuantitativas que no sigan una distribución normal, se emplearán los correspondientes test no paramétricos. La supervivencia global y libre de progresión se estudiarán mediante las curvas de Kaplan Meier. Se empleará la regresión de Cox para establecer la influencia de otras características basales. Se garantizará un nivel de significación del 5%. Se empleará el programa informático SPSS 17.0 para todos los análisis.

Reclutamiento y datos clínicos

Este proyecto se realizará en la Unidad de fase 1 de START Madrid CIOCC, en el Hospital Universitario de Sanchinarro en colaboración directa con la Unidad de Mama del departamentos de Oncología (Centro Oncológico Integrado Clara Campal)

Los miembros que integran el equipo como investigadores clínicos son la Dra Valentina Boni, la Dra Eva Ciruelos, La Dra Raquel Bratos, Natalia Ramirez, Estela Vega, Beatriz Rojas que serán implicados principalmente en el reclutamiento de los pacientes y su seguimiento a lo largo de la enfermedad.

La Dra Valentina Boni como investigadora principal será encargada de coordinar el proyecto y de llevar a cabo un seguimiento directo de todos los resultados obtenidos.

Las enfermera de investigación Sonia Puerta y Maria Yague estarán encargadas de registrar y adjuntar en la historia clínica el consentimiento informado de cada paciente, procesar y almacenar las muestras recogidas durante el ensayo.

Los data manager Laura Varas y Marta Villamor estarán involucrado en la recogida en cuaderno electrónico (CRF) de las datos clínicos/moleculares del estudio y en la creación de la base de datos clínico molecular para análisis de biomarcadores pronósticos y predictivos.

Revisión anatomo patológica:

Todas las muestras tumorales serán revisadas por dos patólogos independientes que resolverán las dudas por consenso. Dichos patólogos permanecerán "ciegos" respecto a cualquier dato identificativo de los casos o acerca de los tratamientos recibidos por el paciente o su evolución clínica. Los mismos patólogos marcarán las regiones de la muestra con mejores celularidad para el estudio molecular.

Secuenciación masiva de DNA tumoral y ctDNA

El análisis molecular del DNA tumoral se efectuará mediante OncoPrint Comprehensive assay v3.0 en el Laboratorio de dianas terapéuticas del Hospital.

El análisis de ctDNA en plasma se efectuará mediante Guardant360.

Estudios en plataforma Nanostring:

Serán realizados en el Laboratorio de Dianas Terapéuticas del Hospital mediante uso de Nanostring y de la plataforma Breast Cancer 360™ gene expression.

Estudios de metilación:

Serán realizados por el Dr Angel Diaz Lagares del Hospital de Santiago de Compostela

Anexo 1:

Consentimiento Informado del Paciente

HOJA DE INFORMACIÓN DEL ESTUDIO Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimado señor/ a:

Se le ha invitado a participar en un estudio de investigación sobre el cáncer titulado **Estudio prospectivos de medición y caracterización del ctDNA mediante biopsia líquida en pacientes con cáncer de mama avanzado para determinar la utilidad clínica de la biopsia líquida**

En este estudio se obtendrán muestras de las pacientes diagnosticadas de cáncer de mama precoz o avanzado actualmente en tto y/o seguimiento en HM Hospital Sanchinarro. Su participación en el estudio es voluntaria. Si no desea participar, esto no tendrá ningún impacto sobre los cuidados médicos que usted reciba. Sus visitas al hospital, los procedimientos que se realicen y el tratamiento que usted reciba se llevarán a cabo según la práctica habitual, de la misma forma que se haría si usted no participase en el estudio. Ni usted ni su médico responsable recibirán compensaciones económicas por participar en el estudio.

Si acepta participar en este estudio se le extraerán muestras de sangre y orina con fines de investigación. Se obtendrá una muestra antes de empezar el tratamiento y otra en el momento de valorar la respuesta de la enfermedad al mismo, así como si se observa un efecto adverso característico. Si por los cuidados médicos que precisa es necesario extraerle algún líquido corporal (por ejemplo, de la cavidad abdominal o pulmonar), también se recogerá esa muestra. Si a finalidad del estudio de fase 1 en el cual participa y/o por motivos clínicos es necesario realizarle una biopsia de tumor, parte del material extraído se utilizará a fin de investigación para este estudio.

Su médico será la persona responsable de la custodia de sus muestras, que se guardarán en su centro hasta el momento del estudio, en condiciones adecuadas para evitar que se deterioren. Las muestras serán codificadas o reversiblemente disociadas. Esto quiere decir que no irán identificadas con sus datos personales, sino con un código y no será posible relacionarle con ellas. Su médico responsable guardará ese código, para poder identificarle en caso necesario (por ejemplo, para poder comunicarle información importante, si usted así lo desea). El código no saldrá de su centro de referencia y solamente su médico podrá relacionarle a usted con los resultados de los estudios que se realicen. Su información médica y personal será tratada de forma confidencial y solo tendrán acceso a la misma los miembros del equipo médico que le atienden habitualmente.

En cumplimiento de la legislación vigente sobre Investigación Biomédica (Ley 14/2007, del 3 de julio y Real Decreto 1716/2011, del 18 de noviembre), le informamos de los siguientes puntos respecto a los estudios con muestras codificadas o reversiblemente disociadas:

A) Finalidad de la investigación: en este estudio participan pacientes con cáncer. Nuestro objetivo es analizar que factores pueden ser importantes en la respuesta del cáncer a los tratamientos empleados, así como en la aparición de efectos tóxicos asociados a dichos tratamientos. También pretendemos identificar factores que nos permitan estimar la evolución de la enfermedad. La duración prevista de la obtención de muestras será de 5 años, aunque el estudio de las muestras puede extenderse más allá de dicho periodo.

Aunque la estructura general del código genético es muy similar en todos los seres humanos, en realidad cada persona presenta pequeñas diferencias con las demás. La función de la mayoría de estas diferencias es aun desconocida, pero sabemos que algunos se asocian con la evolución de distintas enfermedades. En este estudio recogeremos muestras de sangre para obtener ADN (ácido desoxirribonucleico, el material del que están hechos los genes) y ARN (ácido ribonucleico) y otras moléculas similares y analizaremos estas diferencias para intentar establecer asociaciones entre las mismas y la eficacia de los tratamientos y su toxicidad. También se estudiarán en sus muestras la presencia de distintas células y factores moleculares en sangre y orina u otros líquidos biológicos (por ejemplo proteínas y otras sustancias que circulan en la sangre o que se eliminan por la orina) y, si disponible, en tejido tumoral y se correlacionarán con la eficacia y toxicidad de los tratamientos empleados. También recogeremos información sobre su historial médico y sobre el uso de medicación habitual para obtener información que pudiera tener relevancia sobre nuestro estudio. Las muestras donadas solo serán utilizadas en este proyecto de investigación, tal y como indica el

apartado 2 del artículo 22 del Real Decreto 1716/2011, del 18 de noviembre.

B) Beneficios esperados: su colaboración puede ayudar a avanzar en la investigación del cáncer, aunque también es posible que no se obtenga ningún resultado concluyente. Es poco probable que este estudio pueda aportarle un beneficio a usted en concreto. Los resultados de los estudios que se realicen serán presentados en congresos y publicados en revistas del campo de la oncología, para que puedan ayudar a otros investigadores a desarrollar su tarea. Sus datos personales no figurarán en estas publicaciones y por lo tanto no será posible identificarle a usted a través de las mismas.

C) Posibles inconvenientes vinculados con la donación y obtención de la(s) muestra(s): las posibles complicaciones asociadas con la extracción de sangre son la posibilidad de aparición de dolor, hematoma y excepcionalmente, infección en el punto de extracción. Siempre que sea posible, se obtendrá sangre aprovechando una extracción de sangre que se le tenga que hacer por otro motivo. Los riesgos de los procedimientos de obtención de líquidos corporales (por ejemplo, de la cavidad pulmonar o abdominal) se le explicarán por separado.

Una biopsia es un procedimiento realizado con el fin de extraer una pequeña muestra de tejido del tumor para ser evaluada en un laboratorio. El tipo de biopsia que se realizará (por ejemplo, biopsia con aguja) dependerá de las características de su tumor.

El médico le explicará todos los detalles relacionados con el procedimiento de la biopsia que sea específica de su tumor, incluidos sus posibles riesgos.

No obstante, nunca se realizarán estos procedimientos exclusivamente para obtener muestras para el estudio, solamente si son necesarios para su atención médica. También es posible que se intente contactar más adelante con el fin de obtener nuevos datos u otras muestras.

D) El responsable de la investigación es el la Dra. Valentina Boni.

E) Tiene usted derecho a revocar el consentimiento en cualquier momento. En ese caso su muestra será completamente anonimizada o, si usted lo desea, destruida. Esto no afectará a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo. La revocación del consentimiento se la deberá comunicar a su médico responsable y no repercutirá sobre la asistencia que usted reciba. También tiene derecho a incluir alguna restricción sobre el uso de sus muestras. Tal y como establece la legislación vigente, la donación de las muestras conlleva la renuncia a cualquier derecho de naturaleza económica, patrimonial o potestativa sobre los resultados o potenciales beneficios que puedan derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con la muestra que cede para investigación, sin perjuicio de que se pueda fijar una compensación económica por los inconvenientes derivados de la obtención de la muestra.

F) Al terminar la investigación, las muestras se conservarán para poder realizar otros estudios dentro de la línea de investigación del cáncer, incluyendo las realizadas por terceros, tal y como prevé la legislación vigente (Ley 14/2007, del 3 de julio y Real Decreto 1716/2011, del 18 de noviembre). Estas investigaciones se realizarán siempre bajo la responsabilidad y custodia de su médico responsable, cumpliendo los requerimientos previstos en la legislación vigente y con el único objetivo de avanzar en la investigación del

cáncer. En cumplimiento de la legislación, en el caso que usted lo desee, su médico pondrá a su disposición la información sobre el uso de sus muestras. El Comité de Ética de la Investigación que evaluó el proyecto de investigación decidirá en qué casos será imprescindible que se envíe la información de manera individualizada. Una vez finalizado el proyecto, sus muestras serán depositadas en un biobanco o se integrarán en una colección, tal y como dispone el Real Decreto 1716/2011, del 18 de noviembre. Si lo desea, puede indicarnos su preferencia al respecto.

G) Tiene usted derecho a conocer los datos genéticos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas.

H) Sus datos serán tratados con absoluta confidencialidad de acuerdo a la legislación vigente, de manera que será imposible asociarle a usted con los resultados del estudio. Solamente los médicos que le atienden y el personal dedicado a la monitorización clínica del proyecto tendrán acceso a sus datos personales. Su nombre e iniciales no aparecerán en ningún documento del estudio. Su nombre será sustituido por un código. El código que figure en el documento será guardado por su médico, para evitar que terceras personas tengan acceso a los datos. Sus datos no serán accesibles para otras personas que participen en la investigación.

I) Es posible que los resultados de los estudios realizados puedan ser relevantes para su salud, aunque esto es poco probable. En el caso de que se obtengan datos relevantes para su salud, puede indicarnos si desea ser contactado para que se le comuniquen dichos resultados. Para ello debe indicar su decisión en la hoja que se le presentará más adelante para firmar.

J) En caso de que se obtenga información relevante para su salud y que manifieste su interés en que dicha información le sea comunicada, usted deberá valorar la conveniencia de transmitir dicha información a sus familiares. Si lo desea, su médico puede ayudarle a discutir la necesidad de transmitir dicha información a otras personas y de que reciba asesoramiento de una unidad de consejo genético.

K) Como ya se le ha comentado, es posible que sea necesario contactar con usted, por lo que podremos solicitarle información sobre el modo de hacerlo.

L) En el caso de que sus muestras se incorporen a un biobanco al finalizar el proyecto y de que se produzca un eventual cierre del mismo o revocación de la autorización para su constitución y funcionamiento, la información sobre el destino de las muestras estará a su disposición en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica con el fin de que pueda manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto para las muestras.

Sus datos personales se tratarán de acuerdo a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre. Si desea ejercer en cualquier momento los derechos de acceso, rectificación, cancelación, u oponerse al tratamiento de sus datos personales para las finalidades indicadas, deberá hacerlo poniéndose en contacto con su médico responsable o con el investigador principal de este proyecto.

En el caso de que usted haya sido diagnosticado de un tumor, nos gustaría pedir su autorización para solicitar y estudiar las biopsias que se le han realizado previamente, en los términos que se han expuesto en los puntos anteriores, siempre que esto no interfiera con los procesos diagnósticos que pudieran ser precisos para el tratamiento de su enfermedad. Esto puede ser muy importante para confirmar los posibles hallazgos

del estudio. Para ello debe indicar su decisión en la hoja que se le presentará más adelante para firmar.

Si tiene alguna duda o pregunta sobre su participación en este estudio y sobre sus derechos, debe contactar

con:

Dra Valentina

Boni.....

Teléfono:.....91 756 78 25.....

CONSENTIMIENTO DEL PACIENTE POR ESCRITO

Estudio prospectivos de determinación de factores clínicos y moleculares prognosticos y predictivos en pacientes con cáncer de mama precoz o avanzado.

Yo,

D/Dña.....

.....

Bibliografia

1. Eroles P, Bosch A, Alejandro Pérez-Fidalgo J, Lluch A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev.* 2012; **38**(6): 698- 707.
2. Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. *Am J Pathol.* 2013; **183**(4): 1113- 1124.
3. C. Sotiriou, P. Wirapati, S. Loi, A. Harris, S. Fox, J. Smeds, et al., Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis, *J. Natl. Cancer Inst.* 98 (2006) 262–272.
4. B.M. Müller, E. Keil, A. Lehmann, K.-J. Winzer, C. Richter-Ehrenstein, J. Prinzler, et al., The EndoPredict Gene-expression assay in clinical practice - performance and impact on clinical decisions, *PLoS One* 8 (2013) e68252
5. T. Nielsen, B. Wallden, C. Schaper, S. Ferree, S. Liu, D. Gao, et al., Analytical validation of the PAM50-based prosigna breast cancer prognostic Gene signature assay and nCounter analysis system using formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens, *BMC Cancer* 14 (177) (2014)
6. A. Sapino, P. Roepman, S.C. Linn, M.H.J. Snel, L.J.M.J. Delahaye, J. van den Akker, et al., MammaPrint molecular diagnostics on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, *J. Mol. Diagn.* 16 (2014) 190–197
7. B. Gyórfy, C. Hatzis, T. Sanft, E. Hofstatter, B. Aktas, L. Pusztai, Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future, *Breast Cancer Res.* 17 (2015) 11
8. Husain H, Phallen J, Parpart-Li S, et al. A non-invasive liquid biopsy approach for therapeutic stratification of lung cancer patients. *J Clin Oncol.* 2015; **33**(15): e19082- e19082.
9. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017; **14**: 531- 548.
10. Haber DA, Velculescu VE. Blood-based analyses of cancer: circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Cancer Discov.* 2014; **4**(6): 650- 661.
11. Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol.* 2014; **32**(6): 579- 586.
12. Forshew T, Murtaza M, Parkinson C, et al. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med.* 2012; **4**(136): 136ra68.
13. Kaisaki PJ, Cutts A, Popitsch N, et al. Targeted next-generation sequencing of plasma DNA from cancer patients: factors influencing consistency with tumour DNA and prospective investigation of its utility for diagnosis. *PLoS One.* 2016; **11**(9): e0162809.
14. Garcia-Murillas I, Chopra N, Comino-Méndez I, et al. Assessment of Molecular Relapse Detection in Early-Stage Breast Cancer. *JAMA Oncol.* Aug 2019
15. Chae YK, Davis AA, Jain S, et al. Concordance of genomic alterations by next-generation sequencing in tumor tissue versus circulating tumor DNA in breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2017; **16**(7): 1412- 1420.