

Cayol, Federico

Evaluación del valor pronóstico de la biopsia líquida en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello localmente avanzado en una serie de pacientes de Argentina que recibieron radioterapia concomitante con dosis altas de cisplatino o cetuximab

Maestría en Investigación Clínica

Tesis 2022

Cita sugerida: Cayol F. Evaluación del valor pronóstico de la biopsia líquida en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello localmente avanzado en una serie de pacientes de Argentina que recibieron radioterapia concomitante con dosis altas de cisplatino o cetuximab. [tesis de maestría] [internet]. [Buenos Aires]. Instituto Universitario Hospital Italiano de Buenos Aires; 2022 [citado AAAA MM DD]. 42 p. Disponible en: <https://trovare.hospitalitaliano.org.ar/descargas/tesisytr/20230731100845/tesis-cayol-federico.pdf>

Este documento integra la colección Tesis y trabajos finales de Trovare Repositorio del Institucional del Instituto Universitario Hospital Italiano de Buenos Aires y del Hospital Italiano de Buenos Aires. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente. Para más información visite el sitio <http://trovare.hospitalitaliano.org.ar/>



Maestría de Investigación Clínica
Instituto Universitario Hospital Italiano

Evaluación del valor pronóstico de la biopsia líquida en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello localmente avanzado en una serie de pacientes de Argentina que recibieron radioterapia concomitante con dosis altas de cisplatino o cetuximab

Cohorte 2019

Maestrando: Dr. Federico Cayol¹

Tutor de Tesis: Dr. Diego Giunta²

Director de tesis: Dr. Sergio Neil Specterman¹, Dr. Diego Giunta²

Número de protocolo del estudio: CEPI 5026

¹Sección de oncología, servicio de clínica médica, Hospital Italiano de Buenos Aires.

²Servicio de clínica médica, Hospital Italiano de Buenos Aires.

Dedicatoria

Este proyecto está dedicado a mis queridos hijos Joaco y Martu y especialmente a mi mujer Mechi, porque sin ella este proyecto no hubiera sido posible.

Agradecimiento

Este trabajo que acá ven plasmado, ha significado largas horas de trabajo personal y de sacrificio de horas familiares.

Quiero agradecer a los Dres. Diego Giunta y Sergio Specterman que desde el principio me han ayudado a llevar a cabo este proyecto.

Índice

Lista de abreviaturas y diccionario de conceptos utilizados en el texto	6
Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
Pregunta de investigación	11
Objetivo primario	11
Materiales y métodos	11
Diseño, criterios de inclusión y exclusión y variables consideradas.	11
Procedimientos del estudio	12
Consideraciones estadísticas	12
Cálculo de la mínima diferencia detectable	12
Análisis estadístico	13
Consideraciones éticas y consentimiento informado	13
Resultados	14
Discusión	15
Gráficos y tablas	18
Tabla 1: Alteraciones moleculares evaluables en panel Pan Cancer cell free assay, Thermo Fisher [42].	18
Gráfico 1: Alteraciones moleculares encontradas en Cancer Genome ATLAS [43].	18
Gráfico 2: Alteraciones moleculares encontradas International Cancer Genome Consortium [44].	19
Tabla 2: Plataformas N.G.S.: principales características	19
Gráfico 3: Diseño del estudio	20
Gráfico 4: flujo de pacientes evaluados	21
Tabla 3: Características de la población	21
Gráfico 5: Supervivencia libre de progresión mediana de toda la población incluida	22
Gráfico 6: Supervivencia global de la población incluida	23
Tabla 4: Estudios moleculares generales	23
Tabla 5: hallazgos moleculares en las muestras basales	23
Tabla 6: hallazgos moleculares en las muestras post tratamiento	24
Tabla 7: estudios más importantes de biopsia líquida en CECC	25
Referencias	26
Manual operativo de procedimientos	31
Reclutamiento	32
Criterios de inclusión	32
Criterios de exclusión	32
Consentimiento Informado	33
Recolección de muestras	34

Aislamiento de ADNtc	34
Verificación del contenido de ANtc en las muestras	34
Recolección de datos	35
Control de reclutamiento	35
Seguimiento de los participantes visita 1 y 2	35
Tratamiento de quimiorradioterapia	35
Ciego	35
Circuito de calidad	36
Informe de eventos adversos	36
Operacionalización de variables	36
Anexo	39
consentimiento informado	39

Lista de abreviaturas y diccionario de conceptos utilizados en el texto

ADNtc	Ácido desoxirribonucleico tumoral circulante
AJCC	American Joint Committee on Cancer
CECC	Carcinoma epidermoide de cabeza y cuello
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PET/TC	Tomografía con emisión de positrones
Enfermedad mínima residual	Muy bajo volumen de enfermedad que permanece en el cuerpo durante el tratamiento o después de este. No son visibles por los estudios de imágenes disponibles
Biorradioterapia	se denomina así al tratamiento concurrente de radioterapia con cetuximab
Quimiorradioterapia	se denomina así al tratamiento concurrente de radioterapia con cisplatino
Biopsia líquida	La biopsia líquida consiste en examinar material relacionado con el cáncer en una muestra de sangre. Puede incluir la búsqueda de ADNtc, células tumorales, RNA, proteínas y metabolitos.
SLP	Supervivencia libre de progresión
VPH	Virus del papiloma humano
VPH ADNtc	Virus del papiloma humano integrado al ácido desoxirribonucleico circulante
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
Bio-radioterapia	Combinación de tratamiento radiante con el anticuerpo monoclonal Cetuximab
CEOF	Carcinoma epidermoide de orofaringe
NGS	Secuenciación próxima generación
CEPO	Carcinoma epidermoide de primario oculto
CECO	Carcinoma epidermoide de cavidad oral
ddPCR	Droplet digital PCR
POP	Post operatorio

Resumen

Introducción

Los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello (CECC), representan la sexta causa de muerte por cáncer en el mundo. Los tumores localmente avanzados se pueden tratar con quimiorradioterapia. Existe una necesidad insatisfecha para diagnosticar de forma temprana a los pacientes con persistencia de enfermedad luego de dicho tratamiento. La detección del ADNtc podría ser utilizado con este propósito.

Por este motivo utilizamos un panel molecular para evaluar si la persistencia de la detección del ADNtc, luego del tratamiento, se asocia a una menor supervivencia libre de progresión en una cohorte de pacientes con CECC tratados con quimiorradioterapia.

Materiales y métodos

Estudio analítico con diseño de cohorte prospectiva, en un único centro universitario (Hospital Italiano de Buenos Aires), que incluyó pacientes con una edad ≥ 18 años, con diagnóstico de CECC estadio III-IV de la 7^o edición de la AJCC, que recibieron tratamiento definitivo de quimiorradioterapia, desde 11/2019 hasta 05/2022. Se realizó una extracción de sangre basal y otra a las 4-8 semanas de finalizado el tratamiento. Para el análisis del ADNtc se usó el kit Pan Cancer cell free assay de Oncomine (Thermo Fisher).

El objetivo primario del estudio fue evaluar la asociación entre la persistencia de detección del ADNtc post tratamiento con la supervivencia libre de progresión (SLP) utilizando curvas de Kaplan Meier.

Resultados

Se incluyeron 27 pacientes con diagnóstico de CECC localmente avanzado de acuerdo al TNM 7 ed. La edad mediana de los pacientes fue de 62 años (IQR 54-71). La localización tumoral predominante fue la orofaringe. 78% de los pacientes utilizaron cisplatino como radiosensibilizante y el 96% de estos completó el tratamiento radiante. La mediana de tiempo de seguimiento para el objetivo primario fue de 11,5 meses.

Respecto al análisis del ADNtc en las muestras previas al tratamiento, sólo fue detectable en el 29% (7/24) de los pacientes y en el 42% (10/24) de los casos las muestras no fueron válidas para su estudio, por fallas pre analíticas. De los 20 pacientes en los que se analizó la muestra post tratamiento el 80% (16/20) de las mismas no fueron válidas para su estudio. Por esta razón, no se pudo analizar el objetivo primario del estudio. De forma descriptiva se observó que los 3 pacientes con ausencia de detección del ADNtc luego del tratamiento, no presentaron recaída de su enfermedad.

Conclusión

En nuestro estudio no pudimos evaluar la asociación entre la supervivencia libre de progresión y la persistencia de detección del ADNtc debido a la elevada tasa de muestras inadecuadas para su análisis. A pesar de esto observamos que ninguno de los pacientes que presentaron negativización del biomarcador presentó recaídas.

Consideramos que sigue vigente la identificación de un biomarcador para la detección temprana de la persistencia o recaída de enfermedad.

Abstract

Introduction

Squamous cell carcinomas of the head and neck (HNSCC) represent the sixth leading cause of cancer death in the world. Locally advanced tumors can be treated with chemo-radiotherapy. There is an unmet need for early diagnosis of persistent disease after such treatment. ctDNA (circulating tumor DNA) detection could be used for this purpose.

For this reason, we used a molecular panel to assess whether persistent detection of ctDNA after treatment is associated with lower progression-free survival in a cohort of HNSCC patients treated with chemo-radiotherapy.

Materials and methods

Analytical study with prospective cohort design was performed in an university Hospital (Hospital Italiano de Buenos Aires), which included patients aged ≥ 18 years, diagnosed with HNSCC stage III-IV of the 7th edition of the AJCC, who received definitive chemo-radiotherapy treatment, from 11/2019 to 05/2022. A baseline blood sample was taken and another sample 4-8 weeks after the end of treatment. For ctDNA analysis, the Oncomine Pan Cancer cell free assay (Thermo Fisher) was used.

The primary objective of the study was to assess the association between post-treatment ctDNA detection and progression-free survival (PFS) using Kaplan Meier curves.

Results

Twenty-seven patients diagnosed with locally advanced HNSCC were included. The median age of the patients was 62 years (IQR 54-71). The predominant tumor location was the oropharynx. 78% of the patients utilized cisplatin as a radiosensitizer and 96% of the patients completed the radiation treatment. Median follow-up time for the primary endpoint was 11.5 months.

Regarding the analysis of ctDNA in the samples prior to treatment, it was only detectable in 29% (7/24) of the patients and in 42% (10/24) of the cases the samples were not valid for their study due to pre analytics failures. Of the 20 patients in whom post-treatment samples were taken, 80% (16/20) of them were not valid for study. For this reason, the primary objective of the study could not be analyzed. Descriptively, it was observed that the 3 patients with no ctDNA detection after treatment did not present a relapse of their disease.

Conclusion

In our study we were unable to assess the association between progression-free survival and persistence of ctDNA detection due to the high rate of samples inadequate for analysis. Despite this, we observed that none of the patients who presented negativization of the biomarker have presented relapses.

We believe that the identification of a biomarker for the early detection of disease persistence or relapse is still valid.

Introducción

Los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello (CECC) afectan al epitelio escamoso de la cavidad oral, la lengua, la faringe y la laringe. Estos tumores representan la sexta causa más frecuente de cáncer a nivel mundial [1]. Siendo Sudamérica una región con alta incidencia de este tipo tumoral [2].

Los principales factores de riesgo para su desarrollo son el tabaco, el alcohol y en los últimos años, la infección por el virus del papiloma humano (VPH) [3].

En general los CECC localmente avanzados (estadio III-IVa de la 7 edición de la clasificación de la Joint Committee on Cancer (AJCC)), tienen mal pronóstico, con una tasa de supervivencia global a los 5 años menor del 50% [4,5]. Sin embargo, existe un subgrupo de pacientes con carcinomas epidermoides de orofaringe asociados al VPH que tienen mejor pronóstico [6].

Independiente a la biología subyacente del tumor, la recaída locorregional es la forma de progresión que predomina [7].

Una estrategia de tratamiento utilizada con frecuencia, en estos pacientes, es la realización de quimiorradioterapia definitiva [8], reservándose el rescate quirúrgico ante la persistencia o progresión de la enfermedad. El objetivo de diferir la cirugía de rescate, es para disminuir la morbilidad asociada a la misma [9]. Por lo que un aspecto clave en el manejo de estos pacientes es la correcta identificación de los sujetos en donde la cirugía de salvataje es necesaria [9].

Los métodos convencionales utilizados para la evaluar la persistencia de enfermedad, luego de la quimiorradioterapia, tales como el examen físico, la tomografía o resonancia, no son adecuados [10]. Ya que incluso en aquellos pacientes con respuesta clínica completa un 16 a 39% tendrá enfermedad residual microscópica al momento de la cirugía [11,12].

Un estudio randomizado demostró la no inferioridad de la vigilancia con tomografía con emisión de positrones (PET/TC), luego del tratamiento con radioterapia o quimiorradioterapia, reservando la linfadenectomía sólo ante la persistencia de captación con 18-Fluorodesoxiglucosa. Desde la publicación de este estudio, el uso del PET/TC se ha vuelto estándar y actualmente solo se recomienda la linfadenectomía de rescate si la respuesta metabólica del PET/TC no es adecuada [13].

De acuerdo a un metanálisis, el PET/TC en este rol, reportó un valor predictivo positivo del 52-59% y un valor predictivo negativo del 85-95% [13,14]. Este valor predictivo positivo bajo, implica que un porcentaje significativo de pacientes sean sometidos a cirugía de forma innecesaria. Por otro lado, debe tenerse en cuenta, que la mayoría de los trabajos en los que se evaluó la performance del PET/TC como predictor de enfermedad residual, son de centros ultra-especializados, lo que hace difícil la generalización de su resultado.

Por este motivo es muy importante poder identificar un biomarcador que nos permita detectar tempranamente qué paciente presenta mayor riesgo de recaída o persistencia de enfermedad, ya que esto permitiría intensificar el tratamiento o la estrategia de vigilancia en en cada paciente, evitando morbilidades innecesarias e incluso optimizando recursos para el sistema de salud.

La biopsia líquida es un método mínimamente invasivo que permite identificar biomarcadores moleculares en fluidos corporales. La biopsia líquida puede ser utilizada para la detección de pequeños fragmentos de ADN tumoral circulante (ADNtc) originados a partir del recambio celular tumoral, apoptótico o necrótico. El ADNtc puede estudiarse en el plasma y ofrece la posibilidad de ser un biomarcador sensible y específico para una

variedad de aplicaciones, como el diagnóstico, la detección temprana, la obtención de información pronóstica o predictiva de respuesta a los tratamientos [15].

Existen múltiples estudios que han demostrado una buena correlación entre el perfil mutacional del ADNtc y del tejido tumoral [16–18]. Recientemente, en otros modelos tumorales, se demostró que los niveles de ADNtc pueden ser utilizados para monitorear la presencia de enfermedad mínima residual luego de la cirugía [18–20].

En los tumores de cabeza y cuello, esta información está comenzando a desarrollarse. Se evidenció que se puede detectar el genoma del VPH integrado al ADNtc en el 90% de los pacientes con tumores de orofaringe relacionados con este virus [21–24]. Su persistencia luego del tratamiento se asoció con mayor riesgo de recurrencia (HR 10,7, P= 0,002) y de muerte (HR 25,9, P= 0,002) [25]. También se ha demostrado que sus niveles plasmáticos dependen, en parte, del volumen de enfermedad y del estadio [21–24].

En un estudio prospectivo en pacientes con carcinomas epidermoides orofaríngeos asociados al VPH, se utilizó la estrategia de detectar el genoma viral integrado al ADNtc como marcador de enfermedad mínima residual luego del tratamiento de quimiorradioterapia. Se observó que la identificación de 2 muestras consecutivas negativas, se correlacionaron con un valor predictivo negativo del 100% y cuando estas muestras fueron positivas se asociaron a un valor verdadero positivo del 94% para predecir persistencia de enfermedad [26]. Validando esta estrategia en pacientes con tumores relacionados al VPH.

Pero lamentablemente en Latinoamérica, menos del 20% de los CECC están relacionados al VPH [5]. Por lo que consideramos necesario evaluar un panel de biopsia líquida más amplio, para poder beneficiar a todos los pacientes con esta estrategia.

En el momento del diseño de nuestro estudio, el conocimiento acerca de la biopsia líquida en la población VPH negativa era escaso.

En general se utilizaban 2 estrategias para su diseño. La primera era la secuenciación completa del exoma del tumor primario y la posterior selección de las alteraciones moleculares específicas a buscar en el ADNtc de cada paciente. Si bien este plan es el que presenta mayor rédito; es muy caro y complejo para ser utilizado en la práctica asistencial.

Otra de las estrategias utilizadas es la creación de pequeños paneles de secuenciación para intentar cubrir la mayor proporción de alteraciones moleculares de los tumores.

Nosotros utilizamos esta última estrategia, teniendo en cuenta que más del 70% de los CECC presentaron mutaciones en los genes P53, PI3CA o HRAS en las principales bases de datos [27,28] (ver [gráfico 1](#) y [gráfico 2](#)). Por lo que con el uso de un panel que incluya a estas alteraciones, nos aseguramos poder detectar más del 70% del ADNtc en estos tumores.

El panel Pan Cancer cell free assay Thermo Fisher, se encuentra validado para la búsqueda del ADNtc [29], además incorpora muchas de las alteraciones moleculares que presentan estos tumores [27,28] (ver [tabla 1](#)). Otro aspecto, no menos importante es que requiere de un secuenciador ion torrent, que es el que disponemos en el hospital y que tiene una sensibilidad y especificidad comparable a la de las otras plataformas (ver [tabla 2](#)).

Por lo previamente explicado, diseñamos un panel que incluyó la detección del ADNtc con el panel Oncomine Pan Cancer cell free assay de Thermo Fisher [29] en todos los pacientes y una PCR digital para VPH en aquellos con tumores relacionados con este virus [26].

El objetivo de este estudio es evaluar la asociación entre la persistencia del ADNtc post tratamiento con la supervivencia libre de progresión en una cohorte prospectiva de pacientes con diagnóstico de CECC localmente avanzados tratados con quimio-RT o bio-radioterapia (bio-RT).

Pregunta de investigación

En una cohorte de pacientes con diagnóstico de CECC localmente avanzados tratados con quimio-radioterapia o bio-radioterapia, ¿existe asociación entre la detección del ADNtc, posterior al tratamiento, con la supervivencia libre de progresión (SLP)?

Objetivo primario

Evaluar la asociación entre la detección del ADNtc postratamiento con la SLP en aquellos pacientes con diagnóstico de CECC localmente avanzados tratados con quimiorradioterapia o biorradioterapia con al menos 12 meses de seguimiento.

Materiales y métodos

Diseño, criterios de inclusión y exclusión y variables consideradas.

Es un estudio analítico, de una cohorte prospectiva, de un único centro (Hospital Italiano de Buenos Aires). Se incluyó pacientes con diagnóstico de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello localmente avanzado, tratados con radioterapia y tratamiento sistémico concurrente, durante 11/2019 hasta 05/2022. Fecha de cierre del seguimiento fue el 30/09/2022, con un seguimiento mediano para la SLP de 11,5 meses.

Los criterios de inclusión fueron una edad ≥ 18 años, diagnóstico de carcinoma epidermoides de cabeza y cuello estadio III-IVa de acuerdo a la 7° edición de la AJCC [30], indicación de realizar tratamiento definitivo con quimiorradioterapia concomitante con cisplatino dosis altas o con cetuximab y la aceptación de la firma del consentimiento informado. Los criterios de exclusión fueron la alergia a algunos de los componentes del tratamiento sistémico y se excluyeron a los primarios con localización en el cavum por ser considerado una patología diferente (ver [criterios de inclusión](#) manual de procedimientos).

Como variable de interés se consideró a la supervivencia libre de progresión, definida como el periodo de tiempo desde el inicio del tratamiento a la ocurrencia del evento combinado de progresión o muerte [31]. Se determinó a la progresión tumoral como la progresión del tumor primario y/o ganglios regionales y/o enfermedad a distancia. También se incluyó a la aparición de segundos tumores o a la necesidad de realizar una linfadenectomía de rescate con tumor viable luego del tratamiento. Se consideró tanto a la progresión confirmada por biopsia como también por imágenes si no fue biopsiada. Los sujetos fueron objeto de censura al cumplirse la fecha del cierre administrativo del estudio y/o ante la pérdida de seguimiento de los sujetos.

Como variable de exposición se consideró a la detección del ADNtc luego del tratamiento.

Para esto se realizó la extracción de ADN plasmático libre de células con cobas cfDNA sample preparation kit (Roche) y posteriormente se construyeron bibliotecas de NGS utilizando el panel Oncomine Pan Cancer. Las bibliotecas fueron secuenciadas en la plataforma Ion GeneStudio S5 Plus. El análisis bioinformático fue realizado en software Ion Reporter, utilizando un pipeline específico para el panel provisto por el fabricante. Se consideró como positiva a la detección de cualquier variante somática dentro de las regiones cubiertas por el panel, que se encuentren por encima del límite de detección establecido por el pipeline bioinformático para la muestra en cuestión. En los casos en los que se realizó una PCR digital para VPH, si esta amplificó el genoma del VPH integrado al ADNtc, se consideró a la biopsia líquida como positiva.

Otras variables consideradas fueron la edad, el sexo, la historia de tabaquismo, la estadificación por la Clasificación de la AJCC 7^a [30] y 8^a edición [32]. Respecto a las características anatómo-patológica consideradas fueron la localización del tumor primario y en los tumores de orofaringe la presencia del VPH por técnica de inmunohistoquímica (p16-INK4a DAKO) y/o su subtipificación por reacción en cadena de la polimerasa. Del tratamiento se consideró la droga utilizada en concurrencia, el cumplimiento del tratamiento de radioterapia y/o quimioterapia, y la respuesta a dicho tratamiento por TAC/RMN, fibrolaringoscopia y/o PET/TC.

Procedimientos del estudio

Se realizó la extracción de 2 muestras de sangre en cada paciente (ver [manual de procedimientos](#), seguimiento de los participantes visita 1 y 2), una basal antes de iniciar el tratamiento oncológico y la segunda (final) a las 4-8 semanas después de haber terminado dicho tratamiento (ver [gráfico 3](#)). Durante la visita 1 (basal) y 2 (post tratamiento) se realizó una consulta presencial para completar un cuestionario y realizar la extracción de sangre. Posteriormente el seguimiento se realizó de acuerdo a los que figuraba en las evoluciones de la historia clínica electrónica del HIBA y/o por llamado telefónico en los pacientes que continuaron su seguimiento fuera de la institución.

Por cuestiones económicas se procesaron todas las muestras al final del estudio.

Consideraciones estadísticas

Cálculo de la mínima diferencia detectable

Se definió un tamaño de muestra fijo de 40 pacientes, de acuerdo al presupuesto disponible. Se asumió que en concordancia con las cifras internacionales, podría haber recidivas en el 40% de los pacientes (16 pacientes) y que hasta el 12,5% de los pacientes con recidivas (2 pacientes) podrían tener ADNtc negativo luego del tratamiento. Considerando un error alfa de 0,05 y un poder de 0,8 con una prueba bilateral, usamos una prueba de Fisher, con una diferencia mínima del 47,2% (12,5% en los pacientes con recidiva con ADNtc negativo vs 59,7% sin recidiva con ADNtc negativo) que puede detectarse entre la proporción de pacientes con persistencia de detección del ADNtc que tienen recidiva vs aquellos que no.

Creemos que esta diferencia es plausible biológicamente y medible y que probablemente, la diferencia real entre la proporción de pacientes con persistencia de ADNtc detectable con recidiva de enfermedad y sin recidiva es mayor. Por ejemplo, en un estudio que evaluó el rol predictivo de recaída de enfermedad utilizando una tomografía por emisión de positrones en pacientes con carcinomas de cabeza y cuello. Se observó que en 61 pacientes sin recidiva, la tomografía por emisión de positrones fue positiva en el 5% (3/61) y, en los paciente recidivados la tomografía por emisión de positrones fue positiva en un 82% de los casos (14/17). En este caso, la diferencia fue del 77% [33].

El análisis sin censura tiene sentido si consideramos que no se prevé que haya pérdida de seguimiento de los pacientes, ya que en esta patología, son históricamente infrecuentes en nuestro centro. Está previsto usar un modelo proporcional de riesgos para calcular la asociación entre la persistencia de detección del ADNtc post tratamiento y la supervivencia

libre de progresión. No contábamos con información para estimar el cálculo del tamaño de la muestra para esta técnica molecular en el cáncer de cabeza y cuello.

El cálculo de la mínima diferencia detectable se realizó con la versión 14 del software STATA.

Análisis estadístico

A cada paciente se lo considerará como una unidad analítica. Se extremaron medidas para evitar datos erróneos o faltantes.

Todas las variables continuas se presentaron como media, desvío estándar, mediana, Q1, Q3. Las variables categóricas se presentaron como frecuencias absolutas y frecuencias relativas en porcentajes.

Para el objetivo primario, se llevó a cabo un análisis de la supervivencia libre de progresión en todos los pacientes hayan tenido un seguimiento mínimo de 12 meses luego del enrolamiento.

Para el cálculo de la supervivencia libre de progresión, se usó el método de Kaplan Meier. Se calculó la mediana del tiempo transcurrido hasta el evento. El efecto de la detección del ADNtc luego del tratamiento con respecto a la supervivencia libre de progresión se estudió con modelo de regresión de Cox de riesgos proporcionales.

Los valores de p menores de 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Consideraciones éticas y consentimiento informado

Las muestras biológicas obtenidas se utilizaron sólo para los fines de la investigación. No existió ningún costo financiero para el paciente o su sistema de salud. Tampoco hubo compensación o pago por participar.

De acuerdo con la ley de protección de datos personales (Ley 25.326) se garantizó la confidencialidad de los datos de los pacientes (ver manual operativo de procedimientos) y se aseguró que quede claro que en cualquier momento el paciente podía retirar su información del estudio.

Este protocolo fue aprobado por el comité de ética del Hospital Italiano de Buenos Aires (CEPI). Todos los pacientes incluidos prestaron el consentimiento informado (ver manual de procedimiento, [anexo consentimiento informado](#)).

Financiamiento

Para la financiación de los kits moleculares de este proyecto se obtuvo una subvención de Merck Serono Argentina. Durante la realización del estudio, como es de público conocimiento se desarrolló la pandemia por COVID-19, este hecho impactó en la tasa de reclutamiento retrasando algunos hitos a alcanzar, por lo que el laboratorio decidió retirar el 40% del financiamiento al proyecto.

Resultados

Entre noviembre de 2019 hasta mayo de 2022 se evaluaron 64 pacientes, de los cuales 27 sujetos se incluyeron en el protocolo (ver [gráfico 4](#)). La mayoría de los casos excluidos fueron por no cumplir con los criterios de inclusión. Solo 5 casos, que eran potenciales

candidatos para ser incluidos en este estudio, no lo hicieron debido a una suspensión transitoria del reclutamiento.

De los pacientes incluidos, todos presentaron diagnóstico de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello localmente avanzado de acuerdo a la 7a ed. del TNM. La edad mediana de los pacientes fue de 62 años (IQR 54-71), predominó el sexo masculino y se constató el hábito tabáquico en la mayoría de los pacientes. La localización tumoral predominante fue la orofaringe. Todos los pacientes incluidos realizaron tratamiento de radioterapia concurrente con cisplatino (78%) o cetuximab (22%) y en el 96% de los casos se completó el tratamiento radiante, una sola paciente debió suspender por progresión de enfermedad y toxicidad (ver [tabla 3](#)).

A todos los pacientes se les extrajo la muestra basal y a 25 de estos, la muestra al finalizar el tratamiento.

De los pacientes incluidos, en 24 casos se analizó la muestra pre tratamiento, encontrándose en 7 pacientes (29%) la ausencia del ADNtc, en otros 7 pacientes (29%) se detectó dicho biomarcador circulante y en 10 pacientes (42%) las muestras no fueron válidas para su análisis por fallas pre analíticas (muestra hemolizada principalmente).

Para el análisis de las muestras posteriores al tratamiento, se evaluaron 20 casos, observándose en 3 pacientes (15%) la ausencia del ADNtc, en 1 caso (5%) se detectó el biomarcador luego del tratamiento y en 16 sujetos (80%) las muestras no fueron válidas para su estudio por fallas pre analíticas (ver [tabla 4](#)).

Las alteraciones moleculares más frecuentemente encontradas en los pacientes con ADNtc detectado fueron las mutaciones de los genes P53 y PI3CA. Se adjuntan 2 tablas para poder ver estos resultados en las muestra basales (ver [tabla 5](#)) y post tratamiento (ver [tabla 6](#)).

De los 27 pacientes incluidos 12 presentaron persistencia o recaída de enfermedad y 6 pacientes fallecieron. Observándose una supervivencia libre de progresión mediana de 17 meses (ver [gráfico 5](#)) y una supervivencia global de 29.4 meses (ver [gráfico 6](#)).

El análisis del objetivo primario de evaluar la asociación entre la SLP y la detección del ADNtc luego del tratamiento en aquellos pacientes que presentaron el evento o al menos tuvieron 12 meses de seguimiento no fue posible de analizar, debido al elevado número de casos con muestras inadecuadas. Lo que destacamos es que ninguno de los 3 pacientes con ADNtc no detectable post tratamiento, presentaron recaídas. El único paciente con ADNtc detectable en la muestra final, falleció a los 5 meses de finalizado el mismo por una complicación infecciosa por lo que no podemos saber si hubiera presentado enfermedad en su evolución.

Discusión

Los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello (CECC), representan la sexta causa de muerte por cáncer en el mundo. Los tumores localmente avanzados son frecuentemente tratados con quimiorradioterapia. Debido a la fibrosis tisular que conlleva este tratamiento, el seguimiento para poder diagnosticar, las recaídas de forma temprana, es muy complejo.

El examen físico y los métodos de imágenes disponibles para el seguimiento, no son adecuados [10],[11,12]. Incluso el PET/TC que presenta un valor predictivo negativo elevado, su valor predictivo positivo es de solo el 52-59% [13,14]. Lo que ocasiona un número elevado de procedimientos de rescate quirúrgicos innecesarios, impactando en un

mayor deterioro en la calidad de vida de nuestros pacientes y en un mayor costo para el sistema de salud.

Por este motivo consideramos que es muy importante encontrar un biomarcador que nos permita predecir tempranamente el riesgo de persistencia o recaída de enfermedad.

De obtener este biomarcador se podría seleccionar al paciente adecuado para rescatarlo quirúrgicamente o eventualmente intensificar el tratamiento sistémico.

El uso del ADNtc en tumores de cabeza y cuello está menos establecido que en otros tipos tumorales. Sin embargo, en los últimos años, se ha demostrado que es posible su identificación, presentando una posibilidad de usos muy grande.

La mayoría de estos estudios, en tumores de cabeza y cuello, se centran en los tumores asociados al VPH. En una serie de 93 pacientes, se evaluó la utilidad de la RT-PCR para identificar al ADNtc asociado al VPH en muestras en plasma y saliva, mostrando que es más frecuente identificarlo en sangre. En este estudio también se demostró que la identificación del ADNtc post tratamiento se asoció a peor pronóstico y mayor riesgo de recaída [25]. Otro estudio confirmó la mayor sensibilidad de la muestra plasmática independientemente de la localización del tumor primario [34]. Estos estudios nos marcan que la elección, de examinar muestras plasmáticas, que realizamos en nuestro estudio, es la adecuada.

En el año 2020 se publicó una serie prospectiva de pacientes con diagnóstico de carcinomas epidermoides de orofaringe relacionados al VPH tratados con quimioradioterapia. Se utilizó la persistencia de detección del genoma viral como indicador de enfermedad mínima residual. Cuando se consideraron 2 determinaciones consecutivas, la negativización del biomarcador, se asoció a un valor predictivo negativo (VPN) del 100% (IC95%, 96%-100%) y la persistencia de detección a un valor predictivo positivo (VPP) del 94% (IC 95%, 70%-99%), para detectar la persistencia de enfermedad [26]. Además todas las persistencias, de enfermedad encontradas, fueron diagnosticadas confinadas al órgano, lo que permitió realizar un tratamiento local con intención curativa [26]. Existe evidencia que la detección temprana de la recurrencia se asocia a mayor supervivencia global [35,36].

Si bien los resultados son muy buenos esta estrategia solo puede ser utilizada en pacientes con tumores relacionados al VPH.

La utilidad de la biopsia líquida en tumores no relacionados al VPH está empezando a desarrollarse. La mayoría de los estudios publicados son recientes y con bajo número de pacientes (ver [tabla 7](#)).

En el estudio de Susanne Flach, que evaluó el rol del ADNtc como predictor de enfermedad residual, con una plataforma molecular llamada RaDaR. Primero se secuenció al tejido tumoral, para generar ADNtc personalizado para el seguimiento de cada paciente. Este sistema detectó al 87% de los recaídos [37]. Si bien los resultados fueron alentadores, requiere la generación de una firma molecular específica para cada paciente, lo cual encarece mucho el costo y aumenta la complejidad del estudio.

En otro estudio pequeño, de pacientes con CECC no relacionados al VPH, utilizaron una estrategia novedosa. Realizando la secuenciación del ADNtc, evaluando el perfil mutacional y el de metilación [38]. Además consideraron el tamaño, ya que el ADNtc, suele tener un largo de pares de bases menor que el ADN circulante no tumoral [39]. Por otro lado, también secuenciaron a los leucocitos plasmáticos lo que permitió poder identificar las mutaciones correspondientes a la hematopoyesis clonal, disminuyendo considerablemente la tasa de falsos positivos y permitiendo la identificación del ADNtc incluso cuando se encontraba en concentraciones escasas. En este estudio el 66% de los pacientes presentaron ADNtc detectable en la muestra basal y en aquellos pacientes donde persistió

elevado luego del tratamiento se asoció a una menor supervivencia global [38]. Pero el costo y complejidad de este estudio, nos llevó a tomar otra conducta.

De acuerdo a la información publicada en las principales bases de datos de secuenciación masiva en CECC, más del 70% presentaron mutaciones en los genes P53, PI3CA o HRAS [27,28] (ver [gráfico 1](#) y [gráfico 2](#)).

Por este motivo utilizamos un panel comercial que incluyera a estas mutaciones. Asegurándonos, poder detectar más del 70% del ADNtc de los tumores no relacionados al VPH. Utilizar un panel comercial, nos permitió disminuir los costos y la dificultad de llevar a cabo el proyecto.

El panel Pan Cancer cell free assay Thermo Fisher, se encuentra validado, para la búsqueda del ADNtc [29], e incorpora muchas de las alteraciones moleculares que presentan estos tumores [27,28] (ver [tabla 1](#) y [tabla 2](#)).

Recientemente utilizaron una estrategia semejante, en una pequeña cohorte de pacientes, realizando un pequeño panel customizado de secuenciación de próxima generación que incluyó los genes *CASP8*, *PIK3CA*, *FAT1*, *CDKN2A*, *NOTCH1*, *HRAS* y *TP53* [40]. Pudiendo detectar 5 de las 6 recaídas [40]. Lo que confirma nuestra estrategia.

A propósito de esto, con la intención de empezar a desarrollar la realización de paneles de secuenciación de próxima generación, en muestras plasmáticas, en el Hospital Italiano de Buenos Aires, desarrollamos una plataforma molecular amplia integrando al panel Oncomine Pan Cancer Cell Free, junto con el estudio del VPH integrado al ADNtc, para poder ser evaluado tanto en la población relacionada o no al VPH.

Cuando evaluamos el rendimiento del panel oncomine en nuestra serie observamos resultados poco alentadores. Ya que la proporción de pacientes con ADNtc positivo basal fue de sólo el 29% de los casos y lamentablemente en un 42% de los pacientes las muestras, no fueron válidas para su estudio. En las muestras post tratamiento, estos resultados fueron aún peores, con un 80% de muestras inadecuadas para el análisis. Estos resultados inhabilitaron el análisis del panel Oncomine, como biomarcador, en esta población. Por otro lado, debido a la elevada proporción de fallas, pre analíticas, decidimos no realizar el análisis de VPH integrado al ADNtc.

En nuestros pacientes, en los que se pudo detectar el ADNtc, observamos que las mutaciones más frecuentemente encontradas, fueron las mutaciones, en los genes P53 y PI3CA, lo cual es congruente con la información ya conocida de los estudios previos [27][28] Otro punto importante a comentar es, cuál es el momento oportuno, para la toma de la muestra post tratamiento. En nuestro estudio, la elección del momento de la obtención de la muestra al finalizar el tratamiento, se determinó de manera empírica. Dado que, durante el de planificación y desarrolló de la tesis, no se conocía, por completo, la cinética del ADNtc en esta enfermedad. En nuestra práctica habitual al finalizar el tratamiento tenemos 2 consultas sistemáticas importantes. La primera entre la semana 4-8 donde evaluamos la recuperación de las toxicidades y la segunda a los 3 meses, para evaluar la respuesta metabólica del PET/TC.

Hemos notado en nuestros casos, que la consulta entre la semana 4-8, se cumple con mayor frecuencia. En cambio, la visita de los 3 meses, sobre todo en los pacientes del interior del país, se ve retrasada. Con el objetivo de perder la menor cantidad de segundas muestras posibles, fijamos el tiempo de extracción, entre la semana 4-8.

Desde el punto de vista práctico, esta elección, nos permitió haber obtenido la mayoría de las segundas muestras. Posiblemente desde el punto de vista de la evaluación de respuesta, no haya sido la mejor elección. Durante el año 2020, se publicó un estudio de biopsia líquida en tumores de orofaringe VPH relacionados tratados con quimio-radioterapia.

En el mismo, demostraron que al finalizar el tratamiento puede haber un pico transitorio de ADNtc, que luego se negativiza y no tiene implicancias pronósticas [41]. Por lo que es probable que realizar el control a los 3 meses podría ser una mejor decisión.

Para concluir en nuestro trabajo, no pudimos evaluar el objetivo primario de evaluar la asociación entre la persistencia de detección del ADNtc con la SLP, debido a la elevada proporción de muestras no evaluables.

Esta falla pre analítica sistemática, en la toma y conservación de la muestra, a futuro podría disminuirse integrando al centro único de extracción, del Hospital Italiano de Buenos Aires, a los proyectos iniciados por investigador que intentan desarrollar nuevas tecnologías. Por otro lado, probablemente estos resultados podrían mejorarse con la conformación de grupos multidisciplinarios, compuestos por investigadores clínicos y básicos, que ayuden a trasladar la experiencia de cada uno de estos, para el beneficio de los proyectos. Esta fue una de las intenciones de este estudio.

Para finalizar consideramos que este proyecto, nos permitió empezar a desarrollar, la puesta a punto, de este panel en la institución. A futuro se podría convertir en una práctica asistencial. Permitiendo, que nuestra institución, sea una de las pocas que realice esta práctica en la Argentina. De esta manera, podríamos brindar el acceso, a esta tecnología, a un grupo mayor de pacientes de la Argentina.

Como última conclusión de nuestro estudio, pudimos ver como en una situación del mundo real las fallas en una etapa pre analítica vulneran los resultados de los estudios. Esto nos pone en perspectiva la dificultad que tiene la aplicación de este panel en la práctica cotidiana y la importancia de consolidar grupos de trabajos multidisciplinarios.

Lamentablemente no pudimos evaluar la utilidad de la estrategia de combinar una plataforma de NGS junto al análisis del VPH integrado al ADNtc, como predictor de enfermedad mínima residual. Continúa siendo interesante evaluar este objetivo, con un control adecuado de la calidad de la muestra de los pacientes.

Gráficos y tablas

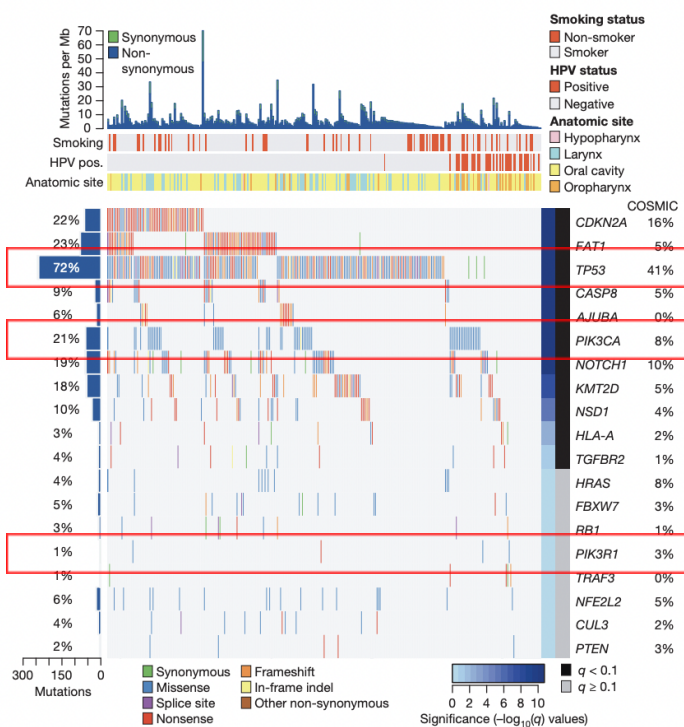
Tabla 1: Alteraciones moleculares evaluables en panel Pan Cancer cell free assay, Thermo Fisher [42].

Assay	Configuration	Unique Genes	DNA	RNA
Pan Cancer	TNA (DNA + RNA)	52	50	12

Hotspot Genes	Tumor Suppressor Genes	Copy Number Genes	Gene Fusions
AKT1	HRAS	APC	ALK
ALK	IDH1	FBXW7	BRAF
AR	IDH2	PTEN	ERG
ARAF	KIT	TP53	ETV1
BRAF	KRAS		FGFR1
CHEK2	MAP2K1		FGFR2
CTNNB1	MAP2K2		FGFR3
DDR2	MET		MET
EGFR	MTOR		NTRK1
ERBB2	NRAS		NTRK3
ERBB3	NTRK1		RET
ESR1	NTRK3		ROS1
FGFR1	PDGFRA		
FGFR2	PIK3CA		
FGFR3	RAF1		
FGFR4	RET		
FLT3	ROS1		
GNA11	SF3B1		
GNAQ	SMAD4		
GNAS	SMO		

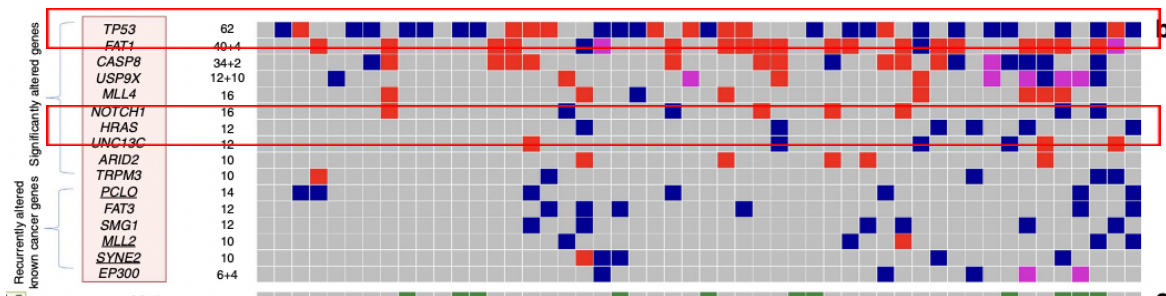
En el panel Pan Cancer cell free assay, incluye algunas de las alteraciones moleculares más frecuentes en estos cánceres (P53, PI3CA y HRAS).

Gráfico 1: Alteraciones moleculares encontradas en Cancer Genome ATLAS [43].



En el Cancer Genome ATLAS, se observó que más del 72% de los tumores presentó alteración de los genes P53, HRAS y PI3CA.

Gráfico 2: Alteraciones moleculares encontradas International Cancer Genome Consortium [44].



En el international Cancer Genome Consortium, se observó que el 74% de los tumores presentó alteración de los genes P53 y HRAS.

Tabla 2: Plataformas N.G.S.: principales características

Nombre	Tipo ácido nucleico	número o genes		Secuenciador
FoundationOne Liquid CDx	ADNtc	324	<ul style="list-style-type: none"> - SNV frecuencia alélica >0.5% Sensibilidad 99.9% y especificidad 100% - Indeles: frecuencia alélica >0.5% Sensibilidad 99.7% y especificidad 100% - Reordenamientos: frecuencia alélica >0.5%, Sensibilidad 100% y especificidad 100% - CNA: ≥ 20%, Sensibilidad 95.3% y especificidad 97.6% Concordancia entre replicados: 97.7% precisión inter lote y 95.9% precisión intra-lote	Illumina
Guardant 360	ADNtc	73	SNV: frecuencia alélica ≥0.25% sensibilidad 99.9% y especificidad 100% Indels: frecuencia alélica ≥0.02% sensibilidad 99.9% y especificidad 96%[49]	Illumina
Oncomine Pan Cancer Cell Free Assay[50]	ADNtc	52	- SNV/indeles: límite de detección de 0,1% de frecuencia de alelos (AF)	Ion Torrent

			<p>con una sensibilidad >80% y una especificidad de >98%</p> <ul style="list-style-type: none"> - SNV/indeles de diana completa TP53: AF 0,5% - Fusiones y omisión del exón MET: límite de detección dell 1 % - CNV: detección de un cambio de 1,4 veces - Sensibilidad 92.2% y especificidad of 99.7%, y valor predictivo positivo 99%[51] 	
--	--	--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

SNV: variaciones de nucleótidos únicos, indeles: inserciones y deleciones, CNA: alteración número de copias.

Gráfico 3: Diseño del estudio

Diseño del estudio, una primer extracción de sangre antes de iniciar el tratamiento y una posterior luego de 4-8 semanas del mismo

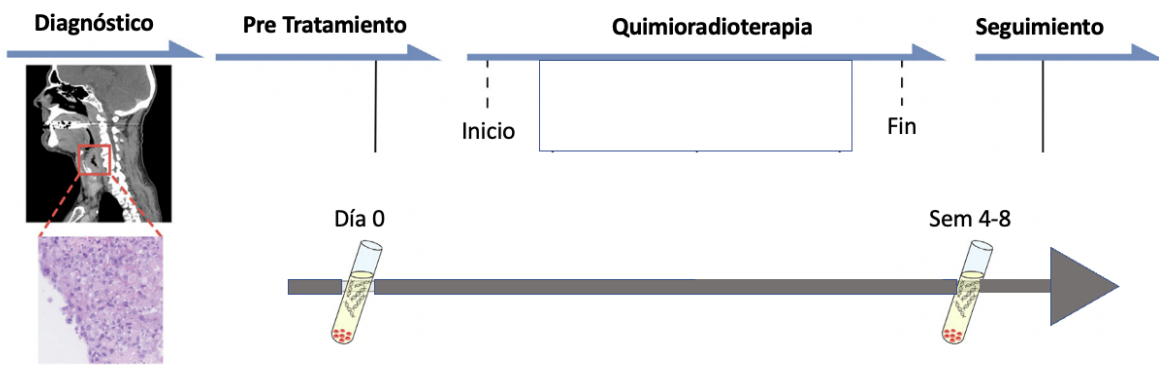


Gráfico 4: flujo de pacientes evaluados

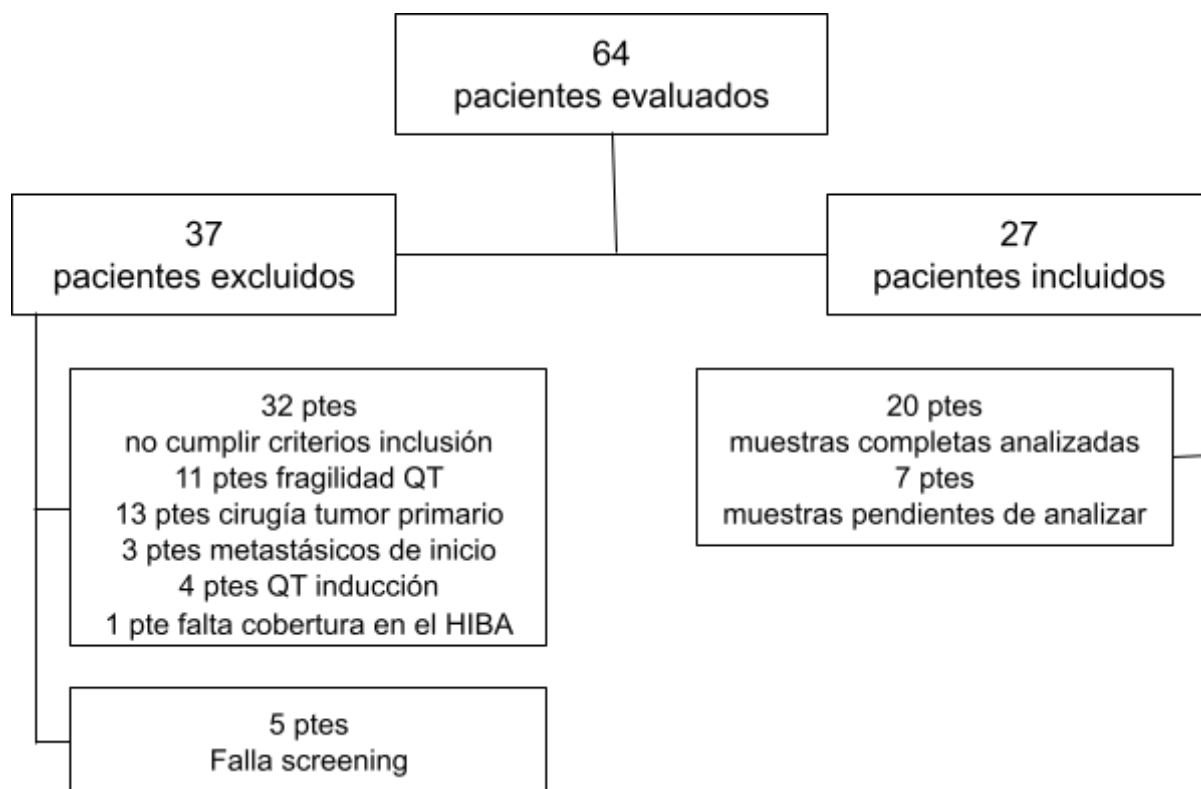


Tabla 3: Características de la población

Características	total de sujetos 100% (27 pts)
Edad mediana	62 años (IQR 54-71)
Sexo masculino	67% (18)
Tabaquismo actual/pasado	77,8% (21)
Localización primario	
Orofaringe	63% (17)
Laringe	7% (2)
Hipofaringe	7% (2)
Senos paranasales	7% (2)
Cavidad oral	11% (3)
primario oculto	4% (1)
Orofaringe P16+	52% (14)
Estadio TNM 7 ed.	
III	30% (8)
IV	70% (19)

Estadio TNM 8 ed.	
I	30% (8)
II	22% (6)
III	19% (5)
IV	30% (8)
Biopsia líquida basal	100% (27)
Biopsia líquida post tratamiento	89% (24)
Radioterapia	100% (27)
Tratamiento sistémico	
Cisplatino	78% (21)
Cetuximab	22% (6)

*producto del redondeo los porcentajes pueden no sumar 100%

Gráfico 5: Supervivencia libre de progresión mediana de toda la población incluida

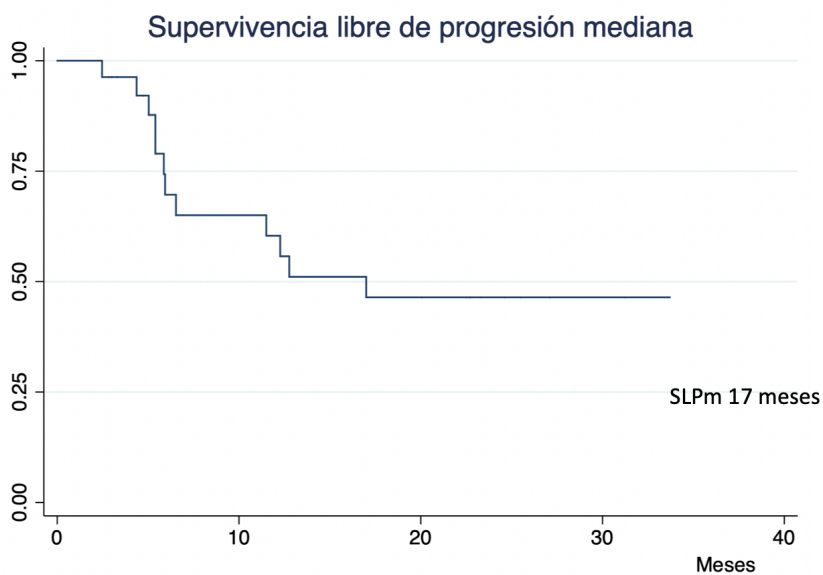


Gráfico 6: Supervivencia global de la población incluida

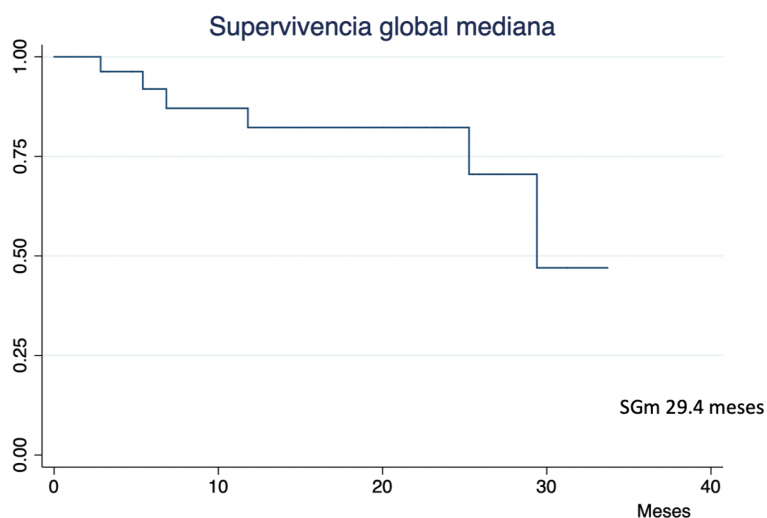


Tabla 4: Estudios moleculares generales

Panel Oncomine	Muestra basal	Muestra final
Detectable	7 (29%)	1 (5%)
No detectable	7 (29%)	3 (15%)
Falla pre analítica	10 (42%)	16 (80%)
Total	24 (100%)	20 (100%)

Tabla 5: hallazgos moleculares en las muestras basales

Caso	tipo de mutación	Frecuencia alélica	Lectura mediana	Patogenicidad ACMG	Funcionalidad
1	KRAS G12A	2,11%	11.1	Patogénica/probablemente patogénica	Ganancia de función
2	PIK3CA p.E542K	0,58%	19.0	Patogénica	Ganancia de función
7	PIK3CA p.E542K	1,24%	20.8	Patogénica	Ganancia de función

10	TP53 p.P151S	6,45%	14.2	Patogénica/probablemente patogénica	Perdida de función
11	TP53 p.R175H	40,0%	47.8	Patogénica	Perdida de función
12	TP53 p.H178TfsTer69	2,49%	9.5	Patogénica	Perdida de función
16	PIK3CA p.E545K	6,49%	61.7	Patogénica/probablemente patogénica	Ganancia de función

1 National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV001803998.1], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV001803998.1> (accessed Jan. 28, 2023).

2-3 National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000031944.22], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000031944.22> (accessed Jan. 28, 2023).

10 National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000012370.15], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000012370.15> (accessed Jan. 28, 2023).

11 National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000154089.2], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000154089.2> (accessed Jan. 28, 2023).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000012374.41> (accessed Jan. 28, 2023).

12 National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000376625.17], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000376625.17> (accessed Jan. 28, 2023).

16 National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000013655.34], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000013655.34> (accessed Jan. 28, 2023).

Tabla 6: hallazgos moleculares en las muestras post tratamiento

Caso	Tipo de mutación	Frecuencia alélica	Lecturas medianas	Patogenicidad ACMG	Funcionalidad
5	TP53 p.K132R	0,75%	9.5	Patogénica	Pérdida de función

5 National Center for Biotechnology Information. ClinVar; [VCV000376625.17], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/VCV000376625.17> (accessed Jan. 28, 2023).

Tabla 7: estudios más importantes de biopsia líquida en CECC

Autor	N=	Contexto	Plataforma	Detección ctDNA	Sensibilidad	Especificidad
Wang Yuxuan [34]	93	CECC p16+ o-	- ADNtc VPH gen E6 - PCR multiplex (TP53, PI3KCA, CDKN2A) - Genoma completo	Saliva 96% y plasma 87%	Detectó 2/4 recaídas	
Sun Ahn [25]	93	CEOF CEPO	ADNtc VPH 16 gen E 6 y 7	Saliva 53%, plasma 67% y ambos 76%	Post tratamiento <ul style="list-style-type: none"> • Saliva 18.8% • Plasma 55% • Combinado 69.5% 	Post tratamiento <ul style="list-style-type: none"> • Saliva 96% • Plasma 95.6% • Combinado 90.7%
Chera Bhishamjt [41]	115	CEOF P16+	ADNtc VPH ddPCR	99.3%	100%	99%
Franz Hilke [45]	20	CECC p16 – o +	NGS local ADNtc VPH	85%	No reportada	No reportada
Joost H. van Ginkel [46]	6	CECC TP53 mut	ddPCR P53	100%	No reportada	No reportada
Ying Cui [47]	11	CECO	Panel customizado 7 genes (<i>CASP8</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>FAT1</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>NOTCH1</i> , <i>HRAS</i> y <i>TP53</i>).		Detectó 5/46 recaídas	
Susanne Flach [48]	46 pts P16 -	CECC P16- POP	RaDaR Sec. exoma tumor primario y ADNtc específico	87%	100%	100%

CEOF: carcinoma epidermoide de orofaringe, NGS: secuenciación próxima generación, CEPO: carcinoma epidermoide de primario oculto, CECO: carcinoma epidermoide de cavidad oral, ddPCR: droplet digital PCR, POP: post operatorio

Referencias

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov 12;68(6):394–424.
1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68: 394–424.
2. Perdomo S, Martin Roa G, Brennan P, Forman D, Sierra MS. Head and neck cancer burden and preventive measures in Central and South America. *Cancer Epidemiol*. 2016;44 Suppl 1: S43–S52.
3. Website. [cited 22 Jul 2019]. Available: www.hpvcentre.net
4. Huang SH, O'Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Current Treatment Options in Oncology*. 2017. doi:10.1007/s11864-017-0484-y
5. Abrahão R, Perdomo S, Pinto LFR, Nascimento de Carvalho F, Dias FL, de Podestá JRV, et al. Predictors of Survival After Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in South America: The InterCHANGE Study. *JCO Glob Oncol*. 2020;6: 486–499.
6. Vokes EE, Agrawal N, Seiwert TY. HPV-Associated Head and Neck Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015. p. djv344.
7. Oksuz DC, Prestwich RJ, Carey B, Wilson S, Senocak MS, Choudhury A, et al. Recurrence patterns of locally advanced head and neck squamous cell carcinoma after 3D conformal (chemo)-radiotherapy. *Radiat Oncol*. 2011;6: 54.
8. Bourhis J, Amand C, Pignon J-P. Update of MACH-NC (Meta-Analysis of Chemotherapy in Head & Neck Cancer) database focused on concomitant chemoradiotherapy. *J Clin Oncol*. 2004;22: 5505–5505.
9. Machtay M, Moughan J, Trotti A, Garden AS, Weber RS, Cooper JS, et al. Factors associated with severe late toxicity after concurrent chemoradiation for locally advanced head and neck cancer: an RTOG analysis. *J Clin Oncol*. 2008;26: 3582–3589.
10. Agarwal V, Branstetter BF 4th, Johnson JT. Indications for PET/CT in the head and neck. *Otolaryngol Clin North Am*. 2008;41: 23–49, v.
11. Argiris A, Stenson KM, Brockstein BE, Mittal BB, Pelzer H, Kies MS, et al. Neck dissection in the combined-modality therapy of patients with locoregionally advanced head and neck cancer. *Head Neck*. 2004;26: 447–455.
12. Frank DK, Hu KS, Culliney BE, Persky MS, Nussbaum M, Schantz SP, et al. Planned neck dissection after concomitant radiochemotherapy for advanced head and neck cancer. *Laryngoscope*. 2005;115: 1015–1020.
13. Mehanna H, Wong W-L, McConkey CC, Rahman JK, Robinson M, Hartley AGJ, et al. PET-CT Surveillance versus Neck Dissection in Advanced Head and Neck Cancer. *N Engl J Med*. 2016;374: 1444–1454.
14. Gupta T, Master Z, Kannan S, Agarwal JP, Ghosh-Laskar S, Rangarajan V, et al. Diagnostic performance of post-treatment FDG PET or FDG PET/CT imaging in head

- and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2011. pp. 2083–2095. doi:10.1007/s00259-011-1893-y
15. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001;61: 1659–1665.
 16. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NCW, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. 2014;20: 548–554.
 17. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014;6: 224ra24.
 18. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008;14: 985–990.
 19. Reinert T, Schøler LV, Thomsen R, Tobiasen H, Vang S, Nordentoft I, et al. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut*. 2015;65: 625–634.
 20. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med*. 2016;8: 346ra92.
 21. Rutkowski TW, Mazurek AM, Śnietura M, Hajduk A, Wygoda A, Skłodowski K. Circulating HPV DNA as a Marker of Treatment Response of Head-and-Neck Cancer Patients Treated With Radiation Therapy or Chemoradiation Therapy. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*. 2014;88: 511.
 22. Damerla RR, Lee NY, You D, Soni R, Shah R, Reyngold M, et al. Detection of Early Human Papillomavirus–Associated Cancers by Liquid Biopsy. *JCO Precision Oncology*. 2019. pp. 1–17. doi:10.1200/po.18.00276
 23. Chera BS, Kumar S, Beaty BT, Marron D, Jefferys S, Green R, et al. Rapid Clearance Profile of Plasma Circulating Tumor HPV Type 16 DNA during Chemoradiotherapy Correlates with Disease Control in HPV-Associated Oropharyngeal Cancer. *Clin Cancer Res*. 2019;25: 4682–4690.
 24. Cao H, Banh A, Kwok S, Shi X, Wu S, Krakow T, et al. Quantitation of Human Papillomavirus DNA in Plasma of Oropharyngeal Carcinoma Patients. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*. 2012. pp. e351–e358. doi:10.1016/j.ijrobp.2011.05.061
 25. Ahn SM, Chan JYK, Zhang Z, Wang H, Khan Z, Bishop JA, et al. Saliva and plasma quantitative polymerase chain reaction-based detection and surveillance of human papillomavirus-related head and neck cancer. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2014;140: 846–854.
 26. Chera BS, Kumar S, Shen C, Amdur R, Dagan R, Green R, et al. Plasma Circulating Tumor HPV DNA for the Surveillance of Cancer Recurrence in HPV-Associated Oropharyngeal Cancer. *J Clin Oncol*. 2020;38: 1050–1058.
 27. Network TCGA, The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015. pp.

576–582. doi:10.1038/nature14129

28. Consortium IPT of TICG, India Project Team of the International Cancer Genome Consortium, Maitra A, Biswas NK, Amin K, Kowtal P, et al. Mutational landscape of gingivo-buccal oral squamous cell carcinoma reveals new recurrently-mutated genes and molecular subgroups. *Nature Communications*. 2013. doi:10.1038/ncomms3873
29. Williamson JB, Solano L, Yuki A, Burkhart VD, Chitwood J, Cao R, et al. Analytical validation of the OncoPrint Pan-Cancer Cell-Free Assay in a CLIA- and CAP-regulated laboratory for detection of solid tumor-derived variants in blood plasma. *J Clin Oncol*. 2019;37: e14614–e14614.
30. Institute NC, National Cancer Institute. *AJCC Cancer Staging Manual 7th Edition. Definitions*. 2020. doi:10.32388/xr3rjy
31. Le Tourneau C, Michiels S, Gan HK, Siu LL. Reporting of time-to-event end points and tracking of failures in randomized trials of radiotherapy with or without any concomitant anticancer agent for locally advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27: 5965–5971.
32. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2017. pp. 93–99. doi:10.3322/caac.21388
33. Martin RCW, Fulham M, Shannon KF, Hughes C, Gao K, Milross C, et al. Accuracy of positron emission tomography in the evaluation of patients treated with chemoradiotherapy for mucosal head and neck cancer. *Head Neck*. 2009;31: 244–250.
34. Wang Y, Springer S, Mulvey CL, Silliman N, Schaefer J, Sausen M, et al. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Transl Med*. 2015;7: 293ra104.
35. Leeman JE, Li J-G, Pei X, Venigalla P, Zumsteg ZS, Katsoulakis E, et al. Patterns of Treatment Failure and Postrecurrence Outcomes Among Patients With Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma After Chemoradiotherapy Using Modern Radiation Techniques. *JAMA Oncology*. 2017. p. 1487. doi:10.1001/jamaoncol.2017.0973
36. Masroor F, Corpman D, Carpenter DM, Ritterman Weintraub M, Cheung KHN, Wang KH. Association of NCCN-Recommended Posttreatment Surveillance With Outcomes in Patients With HPV-Associated Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2019;145: 903–908.
37. Flach S, Howarth K, Hackinger S, Pipinikas C, Ellis P, McLay K, et al. Liquid BIOPsy for MiNimal RESidual DiSease Detection in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (LIONESS)-a personalised circulating tumour DNA analysis in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2022;126: 1186–1195.
38. Burgener JM, Zou J, Zhao Z, Zheng Y, Shen SY, Huang SH, et al. Tumor-Naïve Multimodal Profiling of Circulating Tumor DNA in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2021;27: 4230–4244.
39. Thierry AR, Mouliere F, Gongora C, Ollier J, Robert B, Ychou M, et al. Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Res*. 2010;38: 6159–6175.

40. Shanmugam A, Hariharan AK, Hasina R, Nair JR, Katragadda S, Irusappan S, et al. Ultrasensitive detection of tumor-specific mutations in saliva of patients with oral cavity squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2021;127: 1576–1589.
41. Chera BS, Kumar S, Shen C, Amdur R, Dagan R, Green R, et al. Plasma Circulating Tumor HPV DNA for the Surveillance of Cancer Recurrence in HPV-Associated Oropharyngeal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2020. pp. 1050–1058. doi:10.1200/jco.19.02444
42. Williamson JB, Solano L, Yuki A, Burkhart VD, Chitwood J, Cao R, et al. Analytical validation of the Oncomine Pan-Cancer Cell-Free Assay in a CLIA- and CAP-regulated laboratory for detection of solid tumor-derived variants in blood plasma. *Journal of Clinical Oncology*. 2019. pp. e14614–e14614. doi:10.1200/jco.2019.37.15_suppl.e14614
43. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015;517: 576–582.
44. India Project Team of the International Cancer Genome Consortium. Mutational landscape of gingivo-buccal oral squamous cell carcinoma reveals new recurrently-mutated genes and molecular subgroups. *Nat Commun*. 2013;4: 2873.
45. Hilke FJ, Muyas F, Admard J, Kootz B, Nann D, Welz S, et al. Dynamics of cell-free tumour DNA correlate with treatment response of head and neck cancer patients receiving radiochemotherapy. *Radiother Oncol*. 2020;151: 182–189.
46. van Ginkel JH, Huibers MMH, van Es RJJ, de Bree R, Willems SM. Droplet digital PCR for detection and quantification of circulating tumor DNA in plasma of head and neck cancer patients. *BMC Cancer*. 2017;17: 428.
47. Cui Y, Kim H-S, Cho ES, Han D, Park JA, Park JY, et al. Longitudinal detection of somatic mutations in saliva and plasma for the surveillance of oral squamous cell carcinomas. *PLoS One*. 2021;16: e0256979.
48. Flach S, Howarth K, Hackinger S, Pipinikas C, Ellis P, McLay K, et al. Liquid Biopsy for Minimal Residual Disease Detection in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (LIONESS) – A personalised analysis of circulating cell-free tumour DNA. Abstract- und Posterband - 93. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für HNO-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V., Bonn Interface - Fokus Mensch im Zeitalter der technisierten Medizin. 2022. doi:10.1055/s-0042-1746683
49. Lanman RB, Mortimer SA, Zill OA, Sebisano D, Lopez R, Blau S, et al. Analytical and Clinical Validation of a Digital Sequencing Panel for Quantitative, Highly Accurate Evaluation of Cell-Free Circulating Tumor DNA. *PLoS One*. 2015;10: e0140712.
50. Cao R, Lea K, Jasti M, Schageman J, Hanif K, Li Y, et al. Abstract 5123: Characterization of genetic mutation spectra and identification of gene amplification and fusion variants in cell-free nucleic acid from cultured cancer cell media and liquid biopsy specimens using Oncomine™ Pan-Cancer Cell-Free Assay. *Cancer Research*. 2019. pp. 5123–5123. doi:10.1158/1538-7445.am2019-5123
51. American Association for Cancer Research. AACR 2019 Proceedings: Abstracts 2749-5314. Coe Truman International, LLC; 2019.
52. So M-K, Park J-H, Kim J-W, Jang J-H. Analytical Validation of a Pan-Cancer Panel for Cell-Free Assay for the Detection of Mutations. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11. doi:10.3390/diagnostics11061022

53. Mattox AK, D'Souza G, Khan Z, Allen H, Henson S, Siewert TY, et al. Comparison of next generation sequencing, droplet digital PCR, and quantitative real-time PCR for the earlier detection and quantification of HPV in HPV-positive oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2022;128: 105805.
37. Susanne Flach. Liquid biopsy for minimal residual disease detection in head and neck squamous cell carcinoma (Lioness)- A personalized cell free tumor DNA analysis for patients with HNSCC. *Asco annual meeting 2022. Poster discussion session- Head and Neck cancer. Abstract 6017.*

Manual operativo de procedimientos

Rol	Funciones y responsabilidades	Requerimientos
Inv. principal Dr. Federico Cayol	<ul style="list-style-type: none"> ● Responsable de presentación ante organismos: CEPI ● Cumplimiento de los requisitos establecidos en las GCP ● Garantizar la protección de los derechos, la seguridad y el bienestar del participante ● Conducir y supervisar el estudio ● Confirmación de elegibilidad del participante ● Toma de consentimiento informado ● Seguimiento de participantes ● Entrenamientos y control de sub-investigadores ● Extracción de sangre al paciente ● Presentación de resultados 	<ul style="list-style-type: none"> ● Entrenamiento en Buenas Prácticas Clínicas (GCP). ● Entrenamiento en toma de consentimiento informado ● Experiencia en reclutamiento de pacientes para estudios de investigación ● Experiencia extracción de sangre
Sub-investigadores	<ul style="list-style-type: none"> ● Cumplimiento de los requisitos establecidos en las GCP ● Colaboración en reclutamiento/toma de consentimiento en el caso que investigador principal lo requiera por la pandemia 	<ul style="list-style-type: none"> ● Entrenamiento en Buenas Prácticas Clínicas ● Entrenamiento en toma de consentimiento informado por investigador principal
Analista de datos Dr. Federico Cayol	<ul style="list-style-type: none"> ● Diseño estadístico ● Validación de base de datos ● Análisis estadístico de los datos 	<ul style="list-style-type: none"> ● Entrenamiento en Buenas Prácticas Clínicas ● Manejo de Software estadístico ● Conocimiento en estadística

Reclutamiento

El investigador principal o algún sub-investigador delegado, revisó una vez por semana, la lista de pacientes nuevos evaluados en la sección de oncología del HIBA. Esta base de datos se llenó de forma prospectiva por el secretario de oncología.

Por otro lado, para disminuir la pérdida de candidatos potenciales, el investigador principal, llamó a los otros miembros del equipo de oncología, cada 3 meses explicando los objetivos-existencia/permanencia del estudio clínico y los pasos para derivar a los pacientes para ser incluidos.

En todas las estrategias se brindó información estandarizada sobre el estudio, sus potenciales beneficios y riesgos, marcándose el respeto por la autonomía y la confidencialidad de los datos.

Una vez que se identificó los potenciales candidatos, si cumplían los criterios de inclusión y no presentaban criterios de exclusión. Se habló con el oncólogo de cabecera para ver si estaba interesado en que su paciente participe del estudio. Si el médico de cabecera lo autorizaba, se invitaba al paciente a participar del estudio. Al paciente interesado se le otorgó un turno con el investigador principal (no remunerado por su sistema de salud).

El investigador principal evaluó a los pacientes y chequeó el cumplimiento de los criterios de inclusión y la ausencia de los criterios de exclusión. El investigador documentó con claridad los participantes incluidos y los excluidos con todos sus criterios de inclusión y exclusión en un archivo del drive llamado screening biopsia líquida.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none">• Edad mayor a 18 años.• Diagnóstico anatomopatológico de carcinoma epidermoide de la región de la cabeza y el cuello localmente avanzado (estadio III-IVa de acuerdo a la 7° edición de la clasificación de la AJCC)[30].• Indicación de su médico oncólogo de cabecera de realizar tratamiento definitivo con quimiorradioterapia concomitante con cisplatino dosis altas o con cetuximab.• Firma de consentimiento informado.	<ul style="list-style-type: none">• Alergia a alguno de los tratamientos sistémicos.• Se excluyó a los carcinomas epidermoides de cavum por ser considerados como una patología diferente.• Negativa para participar o para el proceso de consentimiento informado• Dificultades para completar el seguimiento oncológico en el HIBA• Haber iniciado tratamiento previa a la toma de contacto con el investigador

Consentimiento Informado

El investigador principal o algunos de los sub-investigadores delegados, llamó a los pacientes candidatos para invitarlos a participar. O en el caso de los pacientes que se pusieron en contacto con el investigador principal, se evaluó que cumplan con los criterios de inclusión y su deseo de participar del estudio.

Para minimizar el riesgo de infección en contexto de la pandemia COVID 19, no se los hizo venir solamente por este protocolo al hospital, sino que se aprovechó una visita por otro tema, ejemplo: entrevista con su oncólogo para explicar tratamiento oncológico (si no lo hizo por telemedicina) o al momento que recibió la primera infusión de quimioterapia.

El investigador principal o en su defecto el sub-investigador delegado para la toma de consentimiento informado, evacuaron todas las dudas de los participantes, asegurándose de que haya comprendido, de qué se trata participar en el estudio y sus derechos como sujeto de investigación. Que el no aceptar participar del estudio, no iba a modificar el tratamiento, seguimiento o relación médico paciente.

Se hará especial hincapié en el seguimiento y las extracciones de sangre 4-8 semanas después de finalizado el tratamiento.

Luego de la firma del consentimiento, el mismo será archivado y se hará registro en la historia clínica. Se sugiere utilizar una evolución similar a ésta:

[En el día, xx/xx/202x invitamos al paciente a participar de forma voluntaria del estudio llamado: "Evaluación del valor pronóstico de la biopsia líquida en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello localmente avanzado en una serie de pacientes de Argentina que recibieron radioterapia concomitante con dosis altas de cisplatino o cetuximab" en el que participa la Sección de Oncología Clínica del Hospital Italiano. Su negativa a participar del mismo no afectará el seguimiento ni tratamiento del paciente. Es un estudio de investigación de mínima intervención. Está diseñado para personas con diagnóstico de cáncer epidermoide de cabeza y cuello. Con este estudio queremos obtener información sobre los factores moleculares que participan en esta enfermedad. Su participación requerirá la extracción de muestra de sangre, al inicio y al mes de finalizado el tratamiento. El único riesgo será el que conlleva la extracción de sangre. No le generará ningún costo adicional. Su información se manejará de forma anónima. Los resultados de esta investigación podrán ser publicados para fines científicos pero no modificará su tratamiento. El paciente acepta y firma el consentimiento]

Se les brindará un teléfono y mail de contacto del investigador principal y mail del Comité de Ética del Hospital Italiano de Buenos Aires para cualquier consulta. Se archivarán los consentimientos informados con los documentos esenciales de la investigación.

Procedimientos

Se incluyó a todos los participantes que desearon participar del estudio clínico y cumplieron los criterios de inclusión y no presentaron los criterios de exclusión y firmaron el consentimiento informado.

Recolección de muestras

Durante el estudio se realizaron 2 extracciones de sangre, la primera (basal) antes de iniciar el tratamiento oncológico y la segunda (final) 4-8 semanas después de haber terminado dicho tratamiento.

Para la recolección de las muestras, se extrajo 10 ml de sangre, en tubos "Cell Free DNA Collection (Cobas) Roche".

Posteriormente la muestra fue rotulada y llevada por el investigador principal o un sub-investigador, al servicio de anatomía patológica, quien registró y almacenó, de acuerdo a la práctica estándar, para el resguardo de material genético.

Esta sangre se separó en sangre entera, leucocitos, plasma y glóbulos rojos, y luego se congeló a - 80°C.

Aislamiento de ADNtc

Las muestras se recolectaron en tubos "Cell Free DNA Collection (Cobas) Roche", se obtuvo el plasma luego de dos ciclos de centrifugación, primero con la sangre entera a 1600 g durante 10 minutos y luego con la alícuota de plasma a 3000 g durante 10 minutos. La extracción de ácidos nucleicos totales se realizó utilizando MagMAX™ Cell-Free Total Nucleic Acid Isolation Kit.

Verificación del contenido de ANtc en las muestras

La verificación del ADNtc en las muestras se realizó con el equipo Bioanalyzer. De esta forma, fue posible identificar si las muestras tenían ADNtc del tamaño previsto.

Las muestras positivas se amplificaron y analizaron con la lista de genes del panel OncoPrint Pan-Cancer Cell-Free Assay, panel de 52 genes:

- Hotspots en genes: AKT1, ALK, AR, ARAF, BRAF, CHEK2, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB3, ESR1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HRAS, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, MTOR, NRAS, NTRK1, NTRK3, PDGFRA, PIK3CA, RAF1, RET, ROS1, SF3B1, SMAD4, SMO.
- Fusiones génicas: ALK, BRAF, ERG, ETV1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MET, NTRK1, NTRK3, RET, ROS1.
- MET exon 14 skipping
- Variación de número de copias: CCND1, CCND2, CCND3, CDK4, CDK6, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, MET, MYC.
- Genes supresores tumorales: APC, FBXW7, PTEN, TP53.

La amplificación del templado se realizó en equipo Ion Chef y su secuenciación en equipo Ion GeneStudio S5 Plus.

El análisis del VPH en las muestras se llevará a cabo por medio del equipo Hybrid (Master Diagnostic), que incluye un equipo con chips de flujo directo para VPH, seguido por una hibridación que captura más de 30 cepas de alto y bajo riesgo.

Por cuestiones económicas todas las muestras se van a procesar juntas de forma retrospectiva.

Recolección de datos

Los datos clínicos fueron capturados de la historia clínica electrónica del HIBA y de la historia clínica de papel, que aún funciona en el servicio.

Para la adquisición de los datos clínicos se utilizó un formulario prediseñado (google-form) con los datos necesarios, esta encuesta se ha diseñado con datos vitales obligatorios, lo que exige ser llenado para poder terminar y enviar la misma.

Se verificó la completitud de los datos, al momento de cada una de las extracciones, en ese momento de constatarse la ausencia de alguno de estos datos, se preguntó al paciente y/o se llamó al médico oncólogo de cabecera del paciente.

Control de reclutamiento

Durante el estudio, se evaluó la tasa de reclutamiento y se discutieron estrategias de mejoras de la misma.

Seguimiento de los participantes visita 1 y 2

Durante la visita 1 (basal) y 2 (post tratamiento) se realizaron consultas presenciales para completar el cuestionario preformado y la extracción de sangre correspondiente. Posteriormente el seguimiento se realizó de acuerdo a lo que figuraba en las evoluciones de la historia clínica electrónica del HIBA y por llamado telefónico en los pacientes que continuaron su seguimiento fuera de la institución.

En los casos que se evidenció falta de completitud de datos, el investigador principal, contactó al paciente y/o médico tratante. El seguimiento se realizó cada 3 meses para evaluar supervivencia/recaída, se agotaron todas las instancias para minimizar la pérdida de seguimiento. Por este motivo en la primera entrevista se explicó la importancia de tener muestra basal y al finalizar el tratamiento para obtener los resultados buscados y se pidió información de contacto del participante, incluyendo teléfono celular.

Para facilitar la segunda extracción, se otorgó el celular del investigador principal para coordinar la extracción. Cada 3 meses, se evaluó la adherencia del estudio, planteando soluciones para los problemas encontrados.

Tratamiento de quimiorradioterapia

La elección del esquema de tratamiento sistémico (Cisplatino o Cetuximab) acompañante a la radioterapia fue exclusivamente responsabilidad del médico tratante. El investigador principal, no participó en la elección del tratamiento sistémico, ya que este es solo un estudio de biomarcadores.

Ciego

Las muestras biológicas fueron almacenadas hasta que luego de incluir a todos los pacientes se realizó el análisis, lo que permitió mantener el ciego en el estudio.

Circuito de calidad

Para asegurar la calidad del dato, en la visita de inicio presencial, se llenó 1 encuesta de google form pre-formada, con datos sensibles, obligatorios.

Se tomaron datos de teléfono celular para ubicar al paciente en el caso de que haya faltado algún dato.

En la segunda consulta presencial, se aprovechó a completar los datos si hubo alguno faltante.

En el seguimiento de las variables de resultado, muerte y/o recaída, se utilizó la historia clínica electrónica para los pacientes seguidos en el HIBA y/o el llamado telefónico para aquellos que no se siguieron en la institución.

Informe de eventos adversos

Si bien este es un estudio observacional, por exigencias relacionadas con el financiador del estudio, se realizó un reporte resumido y de-identificado de los efectos adversos serios, grado 3-4, de acuerdo a Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v5, según registro en la historia clínica electrónica.

Operacionalización de variables

Se evaluarán las siguientes variables:

VARIABLES DE RESULTADO:

La **supervivencia libre de progresión (SLP)** [31] se definió como el periodo de tiempo desde el inicio del tratamiento hasta la progresión del tumor y/o muerte del paciente, lo que haya ocurrido primero.

Los pacientes sin progresión serán objeto de censura en la última evaluación tumoral válida antes de comenzar un nuevo tratamiento antineoplásico. Los pacientes con enfermedad progresiva (EP) luego de múltiples evaluaciones tumorales consecutivas perdidas o no evaluables fueron objeto de censura en la última evaluación tumoral válida previa a la evaluación perdida o no evaluable. Se cuantificó en meses, con utilización de 1 solo decimal.

Se definió **progresión tumoral**, como una variable cualitativa, dicotómica, considerando a la progresión del tumor primario y/o ganglios regionales y/o enfermedad a distancia. También se incluyó como parte de este evento a la aparición de segundos tumores en la región de la cabeza y cuello y/o a la muerte por cualquier causa. A los pacientes que requirieron una linfadenectomía, de rescate con tumor viable, luego de la radioterapia también se los incorporó dentro de este evento.

Se consideró tanto a la progresión confirmada por biopsia o por imágenes si no fue biopsiada. Los sujetos fueron objeto de censura en la fecha del último seguimiento si estaban vivos y no tuvieron evidencias de progresión tumoral al final del estudio.

VARIABLES DE EXPLICATIVA:

Como variable de explicativa se consideró a la presencia de la **biopsia líquida positiva luego del tratamiento**. Se consideró a la biopsia líquida como positiva como un evento

dicotómico, esto se juzgo de acuerdo al límite de detección pre-especificado por el desarrollador del test Oncomine Pan Cancer liquid biopsy[52] y en aquellos casos de pacientes con tumores asociados al VPH, se realizó la detección del VPH integrado al ADNtc por PCR digital[53]. Se consideró ambos test en su conjunto, con que alguno de ellos se hubiese detectado la persistencia del biomarcador, se lo consideró positivo.

Variables confusoras

1. **ID paciente:** Numérica. **ID_paciente.** Identificador único según aparece en la historia clínica electrónica del hospital italiano. Historia clínica electrónica.
2. **Sexo:** Categórica dicotómica. **sexo_masc.** Según sexo biológico original del paciente. 0: femenino y 1: Masculino. Historia clínica electrónica.
3. **Edad al momento del diagnóstico:** Numérica. **edad_dg.** Años resultante de la diferencia entre la fecha de diagnóstico histológico y la fecha de nacimiento. Historia clínica electrónica.
4. **Fecha de diagnóstico histológico:** Fecha. **Fecha_diagnostic.** Según figura en la historia clínica electrónica o recolectada en el interrogatorio. Historia clínica electrónica.
5. **Fecha de nacimiento:** Fecha. **Fecha_nac.** Según figura en la historia clínica electrónica. Historia clínica electrónica.
6. **Tabaquismo:** Categórica dicotómica. **TBQ.** 0 no tabaquismo; 1 tabaquismo o ex. Historia clínica electrónica.
7. **Tabaquismo cantidad:** solo se completó en aquellos que fuman o han fumado. Variable categórica. 0 <10 paquetes año 1 ≥10 paquetes años
8. **Estado del VPH por IHQ:** categórica. **HPVp16+.** Tinción de P16 por DAKO, reportado en historia clínica electrónica 0 negativa; 1 positiva; 2 no realizado o inclasificable
9. **Estado del VPH por PCR:** categórica. **HPVPCR+.** Técnica de PCR con amplificación del genoma viral según técnica del centro. Reportado en historia clínica electrónica 0 negativa; 1 positiva; 2 no realizado o inclasificable
10. **Localización tumoral:** categórica nominal. Loc_tumor primario: cavidad oral=1, Orofaringe=2, hipofaringe=3, Laringe=4 y Senos paranasales=5
11. **TNM7 edición:** TNM7: categórica: estadio I=1, estadio II=2, estadio III=3, estadio IV=4. Reportado en historia clínica electrónica
12. **TNM8 edición:** TNM8: categórica: estadio I=1, estadio II=2, estadio III=3, estadio IV=4. Reportado en historia clínica electrónica
13. **Régimen con cetuximab o cisplatino:** dicotómica. Esquema concurrencia: cisplatino=1 cetuximab=2
14. **Finalización del tratamiento con cetuximab o cisplatino:** Dicotómica: si=1 no=0. Se considerará al haber realizado todas las aplicaciones del tratamiento planificados (Cisplatino 3 infusiones y Cetuximab 7 infusiones).
15. **Régimen RT:** dicotómica. tipo de irradiación IMRT 1 y 3D 2
16. **Finalización del régimen RT:** Dicotómica: si=1 no=0. Cumplimiento del total de aplicaciones planificadas.
17. **Perfil basal de los oncogenes:** descripción del perfil de mutaciones encontradas en las muestras de sangre previo al tratamiento.
18. **Perfil de los oncogenes al final del tratamiento:** descripción del perfil de mutaciones encontradas en las muestras de sangre previo al tratamiento.

19. **Toxicidad grado III-IV:** dicotómica. Indica la presencia de este tipo de toxicidad. 0 no presentó y 1 presentó
20. **Toxicidad mucosa grado III-IV:** dicotómica. Indica la presencia de este tipo de toxicidad. 0 no presentó y 1 presentó
21. **Toxicidad renal grado III-IV:** dicotómica. Indica la presencia de este tipo de toxicidad. 0 no presentó y 1 presentó
22. **Toxicidad hematológica grado III-IV:** dicotómica. Indica la presencia de este tipo de toxicidad. 0 no presentó y 1 presentó
23. **Otras toxicidades:** variable nominal. Texto libre

Anexo

consentimiento informado

**FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
VERSIÓN 1, FECHA 10/07/2019 ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN**

“Evaluación del valor pronóstico de la biopsia líquida en el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello localmente avanzado en una serie de pacientes de Argentina que recibieron radioterapia concomitante con dosis altas de cisplatino o cetuximab”

TÉRMINOS DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA CASOS

INTRODUCCIÓN


Usted está siendo invitada/o a participar en un estudio para investigar la utilidad de la biopsia líquida (análisis de material genético de los tumores a través de la sangre) en tumores de cabeza y cuello. El estudio se realizará en el Hospital de Italiano de Buenos Aires. Por favor, lea atentamente este formulario de consentimiento y aclare con el coordinador de la investigación o con su médico del hospital cualquier pregunta que tenga sobre el estudio antes de la firma de este. El estudio busca solo investigar factores pronósticos en estos tumores. El diagnóstico, tratamiento y seguimiento va a ser exactamente igual al que corresponde por la práctica habitual a elección de su oncólogo tratante.

PROCEDIMIENTOS

Si Ud. está de acuerdo en participar en este estudio, 1- se le solicitará la autorización para ingresar a su historia clínica para extraer datos anonimizados (que no puedan ser asociados con su nombre); 2- se le solicitará una muestra de sangre antes y después de su tratamiento y una muestra, con la que se hizo el diagnóstico de su tumor, con el objeto de realizar análisis para investigar cuales son los cambios moleculares que se correlacionan con la evolución de su tumor.

EXTRACCION DE SANGRE Y MUESTRAS BIOLÓGICAS Se le solicitará donar una muestra de sangre antes y 4-8 semanas después del tratamiento de radioterapia. Una enfermera le extraerá 15 ml de sangre (una cucharada sopera) de una vena de su brazo, como de costumbre. Si está disponible y Ud. acepta se le solicitará si desea donar una pequeña muestra del tejido que se utilizó para el diagnóstico de su enfermedad, no se va a solicitar una nueva biopsia.

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS La sangre y muestras de tejidos se enviarán a los laboratorios para su análisis. En cada una de estas muestras, se estudiará si existen componentes genéticos relacionados con la evolución de su enfermedad. Sus muestras se almacenarán, por 5 años, para ser utilizadas en los



Dr. Augusto Pérez
Coordinador
Comité de Ética de Fisiología de Investigación
Hospital Italiano Bs. AS

Recibido en el consentimiento informado de...
Recibido en el consentimiento informado por el Comité de Ética de
Fisiología de Investigación del Hospital Italiano
de Bs. AS en fecha del
18 JUL 2019

análisis genéticos correspondiente a los objetivos de este estudio. Pasado dicho plazo serán destruidas.

Se utilizara un panel que evalúa 50 genes (ABL1, AKT1, ALK, APC, ATM, BRAF, CDH1, CDKN2A, CSF1R, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB4, EZH2, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HNF1A, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, JAK3, KDR, KIT, KRAS, MET, MLH1, MPL, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RET, SMAD4, SMARCB1, SMO, SRC, STK11, TP53, VHL).

INFORMACION; RELACION DE COSTO E INDEMNIZACIÓN

Las muestras biológicas obtenidas se utilizarán sólo para fines de investigación. No habrá ningún costo financiero para que usted o su sistema de salud (prepaga, obra social, etc.) participe en este estudio y no hay compensación o pago por participar.

POSIBLES RIESGOS Y MOLESTIAS

Durante la recolección de sangre, Ud. puede sentir algo de dolor o presentar un hematoma (moretón) en el brazo en el lugar donde se inserta la aguja. Es posible pero no probable, que usted presente inflamación o sangrado en el sitio de la punción. Usted también puede experimentar un malestar relacionado con las agujas. El procedimiento es similar a cualquier otra extracción. En caso de que se presentara una herida, se tratará de inmediato por los profesionales del hospital.

POSIBLES BENEFICIOS No habrá beneficios directos para usted, si beneficio potencial de las generaciones futuras. Su participación es importante para el desarrollo de la investigación científica.

GARANTÍA DE CONFIDENCIALIDAD Su nombre no será utilizado en ningún informe, ni divulgado en forma alguna. Sus datos no van a ser revelados porque se mantendrán en anonimato, con un código que solo conoce el investigador del hospital (Dr. Federico Cayol) y que no será proporcionado a otras personas, a fin de que no se ligue ese código con sus datos personales. Ud. En cualquier momento y sin dar explicación alguna, puede solicitar el acceso, rectificación de la información o el retiro del estudio y que sus datos no sean utilizados de acuerdo con la Ley de Protección de Datos Personales (Ley 25.326). Dicha decisión no influirá en la relación con su oncólogo tratante.

DERECHO A RETIRARSE AL ESTUDIO Su participación en este estudio es voluntaria. Puede negarse a participar o retirarse del mismo en cualquier momento, sin que ello afecte en modo alguno el tratamiento médico que está recibiendo. La participación en este estudio es voluntaria, si usted decide participar o no en el mismo, esto no alterara la calidad de la atención que recibe.

Si en un inicio decide dar su consentimiento para el almacenamiento de muestras, pero luego cambia de parecer, puede solicitarle al investigador de su institución, comunicándose con el Dr. Federico Cayol Hospital Italiano de Buenos Aires (tel. 1155933332 o federico.cayol@hospitalitaliano.org.ar.)

CERTIFICACIÓN

Dr. Augusto Pérez
COORDINADOR
Comité de Ética de Fisiología de Investigación
Hospital Italiano Bs. As.

Por... el...
Este...
18 JUL 2013

He leído la explicación sobre el estudio y tuvo la oportunidad de debatir y aclarar mis dudas. Al aceptar participar en este estudio, no renuncio a ningún derecho. Estoy de acuerdo en participar en las partes del estudio que está marcado "sí" y me niego a participar en las partes del estudio que está marcado "no". He recibido una copia de este consentimiento.

SI	NO	Parte del estudio
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Extracción de sangre antes y después del tratamiento. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		Donación de muestras de tejido que se utilizó para el diagnóstico. <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
		Acceso a los registros médicos.

Si Usted tienen preguntas adicionales acerca del estudio sobre sus derechos como participante de un estudio de investigación puede llamar al Comité de Ética en Investigación del Hospital Italiano de Buenos Aires, Coordinado por la Dr. Augusto Pérez (cepi@hospitalitaliano.org.ar), quien está encargado de velar por los derechos de los participantes en esta investigación. El presente consentimiento fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de Protocolos de Investigación del Hospital Italiano de Buenos Aires cumpliendo con todos los parámetros éticos. La dirección médica del Hospital Italiano de Buenos Aires, autoriza a la realización de este protocolo.



Dr. Augusto Pérez
Coordinador
Comité de Ética de Protocolos de Investigación
Hospital Italiano Bs. As

Este consentimiento informado de...
fue aprobado por el Comité de Ética de...
del Hospital Italiano

18 JUL 2013

**CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LA
PACIENTE AUTORIZACION PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO**
"Evaluación del valor pronóstico de la biopsia líquida en el carcinoma
epidermoide de cabeza y cuello localmente avanzado en una serie de
pacientes de Argentina que recibieron radioterapia concomitante con dosis
altas de cisplatino o cetuximab"

Nombre (s) y Apellido (s) del paciente	DNI	
<hr/>		
Teléfono de la casa	Dirección de la casa	
<hr/>		
Firmas: Paciente	Fecha	
<hr/>		
Fecha	Investigador Principal Nombre	DNI
<hr/>		



Dr. Augusto Pérez
Coordinador
Comité de Ética de Protocolos de Investigación
Hospital Italiano Bs. As

4
Este consentimiento informado del
paciente ha sido aprobado por el Comité de Ética de
Protocolos de Investigación del Hospital Italiano
de Bs. As. en reunión del / /
18 JUL 2013