

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
**VALOR DIAGNÓSTICO DE LA DETECCIÓN DE DNA TUMORAL CIRCULANTE EN LÍQUIDO
CEFALORRAQUÍDEO DE PACIENTES CON SOSPECHA DE CARCINOMATOSIS
LEPTOMENÍNGEA**

MEMORIA CIENTÍFICA

CONTENIDO

1. RESUMEN DEL PROYECTO
2. ANTECEDENTES
3. EL DESAFÍO
4. ALCANCE Y OBJETIVOS
5. BIBLIOGRAFÍA
6. EQUIPO
7. PRESUPUESTO

1. RESUMEN DEL PROYECTO

Antecedentes:

El diagnóstico tardío de carcinomatosis leptomeníngica (CLM) en pacientes con cáncer de mama metastásico (CMM) puede retrasar su tratamiento y comprometer su supervivencia.

Hipótesis:

La cuantificación y caracterización de DNA circulante tumoral (ctDNA) en líquido céfalo-raquídeo (LCR; ctDNA-LCR) es un método de diagnóstico más sensible y permite mejorar el tratamiento de CLM.

Objetivos:

- 1.- Determinar la sensibilidad de la detección de ctDNA-LCR para el diagnóstico de CLM;
- 2.- Caracterizar las alteraciones genómicas del ctDNA-LCR y evaluar si esa información puede mejorar el tratamiento de la CLM.

Métodos:

1.- Se obtendrán muestras de LCR de pacientes con CMM y sospecha de CLM por resonancia magnética (RM); se determinará la presencia de células malignas (citología) y se aislará y cuantificará el ctDNA-LCR. Tomando la RM como gold standard, se determinará la sensibilidad de la citología y del ctDNA-LCR para el diagnóstico de CLM. En la eventualidad de defunción, se realizará una autopsia para confirmar el diagnóstico de CLM en aquellas pacientes (y/o familias) que lo consientan.

2.- El ctDNA-LCR será analizado por TagSequencing y PCR digital. Se obtendrán muestras de ctDNA en plasma, tumor primario y otra metástasis y se determinarán sus alteraciones genómicas, que se compararán con las del ctDNA-LCR. Se evaluará la posibilidad de tratamiento dirigido contra una eventual alteración genómica en ctDNA-LCR. Las decisiones sobre el tratamiento serán del médico asistente de cada paciente. Si una paciente recibe tratamiento dirigido por una alteración genómica en ctDNA-LCR, se le pedirá obtener LCR cada 8 semanas tras inicio del tratamiento y en el momento de la progresión de enfermedad, para seguimiento. Se seguirán las pacientes hasta la fecha de exitus y se calculará la supervivencia global tras el diagnóstico de CLM.

Relevancia:

Un diagnóstico tardío de CLM puede retrasar el tratamiento de esta condición potencialmente fatal y que condiciona de manera importante la morbilidad en pacientes con CMM. La detección y cuantificación de ctDNA-LCR sería una metodología innovadora, con potencial de solicitar una patente para el diagnóstico de carcinomatosis meníngea asociada a cáncer de mama. Por otro lado, sabemos que el cáncer de mama tiene alteraciones genómicas contra las que existen, a día de hoy, fármacos dirigidos. Otro objetivo del proyecto es comprobar si las alteraciones presentes en el ctDNA-LCR son similares a las presentes en el tumor primario y en las metástasis, lo que en primer lugar elucidaría mecanismos de evolución clonal en pacientes con CLM secundaria a cáncer de mama. Por otro lado, si consiguiéramos dirigir los tratamientos para la CLM con base en las alteraciones genómicas presentes en las metástasis meníngeas, podríamos potencialmente mejorar el pronóstico de estas pacientes.

2. ANTECEDENTES

La carcinomatosis leptomeníngea se define como la invasión de las leptomeninges por células tumorales malignas. Se calcula que alrededor del 8% de todos los pacientes con cáncer sufrirán esta complicación a lo largo de su enfermedad (1). Además, el riesgo de CLM aumenta de forma directa con el tiempo de supervivencia tras el diagnóstico de cáncer. Por ese motivo, la incidencia de CLM puede estar en aumento debido a que, con los nuevos tratamientos disponibles, el cáncer se está convirtiendo en una enfermedad crónica.

El cáncer de mama es el tumor sólido que más frecuentemente se asocia a CLM (1). En series de autopsia, la incidencia de CLM llega al 16% pese a que solo es clínicamente evidente en aproximadamente el 5% de las pacientes con cáncer de mama metastásico (CMM) (1,2). La CLM es un evento tardío en la historia natural del CMM. Sin embargo,

su diagnóstico tiene implicaciones importantes a nivel pronóstico y de calidad de vida. En general, las pacientes con CLM presentan deterioro neurológico progresivo e inexorable, e tienen un pronóstico nefasto: sin tratamiento, la supervivencia mediana de estas pacientes es de entre 4 y 6 semanas, pudiendo alcanzar los 3-4 meses si se tratan con quimioterapia sistémica y/o intratecal (1,3,4).

La CLM se diagnostica mediante la detección de células malignas en el líquido céfalo-raquídeo (LCR) de pacientes con clínica sugestiva (1,2). Sin embargo, unos 10-15% de los pacientes con evidencia clínica inequívoca de CLM pueden presentar citologías negativas (1,5). Se recomienda que en caso de una primera determinación negativa, se repita hasta 3 veces la obtención de LCR para aumentar la sensibilidad de la técnica (5). Sin embargo, dichas repeticiones puede conllevar molestias para el paciente y aumentar el riesgo de complicaciones asociadas a la técnica. La resonancia magnética (RM) con contraste de gadolinio es la prueba de elección para el diagnóstico radiológico de pacientes con clínica sugestiva de CLM, ya que las tomografías computarizadas (TC) tienen una sensibilidad de aproximadamente el 30% (6,7).

El retraso en el diagnóstico de la CLM puede tener implicaciones clínicas importantes, ya que retrasa el potencial tratamiento dirigido. Así pues, se necesitan técnicas de diagnóstico más sensibles para la CLM asociada a CMM.

Recientemente, el equipo ha demostrado que la detección de ADN tumoral circulante (ctDNA) en LCR (ctDNA-LCR) puede ser una herramienta robusta de diagnóstico de CLM (8). En ese trabajo, se recogieron y analizaron muestras obtenidas para el diagnóstico citopatológico de pacientes con CMM y clínica sospechosa de CLM. En dichas muestras, se encontraron diferencias entre la citología convencional y el análisis de ctDNA-LCR. En una de las pacientes, a pesar de que no se aislaron células malignas en la primera determinación, se detectaron niveles altos de ctDNA-LCR. Por el contrario, las siguientes 2 citologías fueron positivas, coincidiendo con la determinación de ctDNA-LCR. En este caso, el diagnóstico de CLM fue confirmado en la autopsia clínica llevada a cabo tras la defunción. Otro caso interesante fue el de una paciente, para la cual las 3 muestras consecutivas de LCR fueron negativas para células malignas, pese a que nuevamente se detectaron niveles altos de ctDNA-LCR, con frecuencias alélicas medias (FAM) entre 20 y 50% en las 2 muestras disponibles para el análisis. En esta paciente, también se confirmó la presencia de CLM en la autopsia. En el último caso descrito en el artículo, se han podido detectar células malignas y altos niveles de ctDNA-LCR. Estos hallazgos sugieren que el análisis de ctDNA-LCR en pacientes con cuadro clínico sugestivo de CLM puede ayudar en el diagnóstico precoz de esta complicación.

Otra potencial aplicabilidad de la detección de ctDNA-LCR es la de monitorizar la evolución tumoral y la de identificar alteraciones genómicas presentes en el tumor que permitan escoger el tratamiento más adecuado para el paciente. Varios trabajos han demostrado que las mutaciones identificadas en el ctDNA en plasma pueden representar el genoma tumoral (9), tener implicaciones pronósticas y predictivas (10,11), y pueden ser una herramienta para monitorizar la dinámica del tumor (9,12).

En un trabajo reciente, Magbanua et al. describieron una técnica de aislamiento y secuenciación de células tumorales en LCR (13). En ella, los autores estudiaron 15

pacientes con CMM y diagnóstico de CLM, mediante detección de células malignas en LCR o mediante detección de células atípicas en el LCR, con una RM sugestiva de CLM, tratadas en la University of California San Francisco. Las muestras de LCR fueron procesadas según un método en 2 pasos, el cual utilizaba immunomagnetic enrichment and fluorescence-activated cell sorting (IE/FACS), una técnica que también se utiliza para aislar células tumorales circulantes (CTCs).

Posteriormente, se realizó el análisis de número de copias en genoma completo (genome-wide copy number analysis o CNA) por hibridización genómica por arrays comparativa. En 13 de las 15 pacientes (87%) se pudo realizar el análisis genómico. El CNA reveló alteraciones genómicas observadas frecuentemente en tumores primarios de mama y también en las CTCs, indicando su origen tumoral. Otro resultado interesante es que 12 de las 13 muestras que pudieron ser analizadas (92%) presentaba ganancias importantes del locus 8q24, que incluye el oncogén MYC.

A pesar de todo, se desconoce cuál la correlación entre las alteraciones genómicas del tumor primario o de la metástasis y las alteraciones genómicas del ctDNA-LCR. El estudio mencionado anteriormente (8) es uno de los primeros en analizar cómo las alteraciones genómicas halladas en ctDNA-LCR y ctDNA de plasma, representan la diversidad de las mutaciones en las diferentes lesiones de pacientes con cáncer de mama. Para ello, se realizó un análisis exhaustivo de las alteraciones genómicas somáticas de todas las lesiones metastásicas, del LCR y del plasma utilizando un método de targeted sequencing mediante 2 plataformas distintas en muestras de 4 pacientes con CMM a las cuales se les realizó una autopsia. En estos casos, el ctDNA en LCR era más representativo de las lesiones de CNS que otras lesiones viscerales.

En base a lo expuesto, la hipótesis de la presente propuesta es que el análisis de ctDNA-LCR de pacientes con clínica sugestiva de CLM puede ayudar el diagnóstico precoz de la CLM y que dicha detección puede, eventualmente, guiar las decisiones terapéuticas de estas pacientes, mejorando el tratamiento de CLM asociada a CMM.

3. DESAFÍO

Un diagnóstico tardío de carcinomatosis leptomeningea (CLM) puede retrasar el tratamiento de esta condición potencialmente fatal y que condiciona de manera importante la morbilidad en pacientes con cáncer de mama metastásico.

Al día de hoy, la CLM se diagnostica mediante la detección de células malignas en el líquido céfalo-raquídeo (LCR) de pacientes con clínica sugestiva. A pesar de que la citología de LCR es actualmente el gold standard para el diagnóstico de CLM, un 10- 15% de los pacientes con evidencia clínica inequívoca de CLM pueden presentar citologías negativas. Para aumentar la sensibilidad de la técnica, se recomienda que en caso de una primera determinación negativa, se repita hasta 3 veces la obtención de LCR. Sin embargo, dichas repeticiones pueden conllevar molestias para el paciente y aumentar el riesgo de complicaciones. La resonancia magnética (RM) con contraste de gadolinio es la prueba de elección para el diagnóstico radiológico de pacientes con clínica sugestiva de CLM, ya que las tomografías computarizadas (TC) tienen una sensibilidad

de aproximadamente el 30%. Así, pues, se necesitan de manera urgente técnicas más sensibles para el diagnóstico de CLM.

Nuestro grupo ha demostrado que se puede aislar ctDNA de LCR de pacientes con sospecha o con diagnóstico establecido de CLM. Si se confirma que la detección de ctDNA en LCR es más sensible que la citología convencional para el diagnóstico de CLM, se podría adelantar el tratamiento y potencialmente mejorar el pronóstico de esta complicación grave asociada a cáncer de mama. Esta sería una metodología innovadora, con potencial de solicitar una patente para el diagnóstico de carcinomatosis meníngea asociada a cáncer de mama.

Por otro lado, sabemos que el cáncer de mama tiene alteraciones genómicas contra las que existen, a día de hoy, fármacos dirigidos. Otro objetivo del proyecto es comprobar si las alteraciones presentes en el ctDNA-LCR son similares a las presentes en el tumor primario y en las metástasis, lo que en primer lugar elucidaría mecanismos de evolución clonal en pacientes con CLM secundaria a cáncer de mama. Por otro lado, si consiguiéramos dirigir los tratamientos para la CLM con base en las alteraciones genómicas presentes en las metástasis meníngeas, podríamos potencialmente mejorar el pronóstico de estas pacientes.

4. ALCANCE Y OBJETIVOS

Hipótesis / justificación del estudio

La hipótesis de este estudio es que la cuantificación y caracterización de ctDNA-LCR de pacientes con clínica sugestiva de CLM puede:

1. Ser un método de diagnóstico más sensible de CLM. Eso se puede traducir en la identificación precoz de CLM, llevando a un tratamiento más rápido, con el objetivo último de aumentar la supervivencia.
2. Ser un método para la determinación de las alteraciones genómicas presentes en las metástasis meníngeas, con el objetivo último de guiar las decisiones terapéuticas de estas pacientes.

Objetivos

Los objetivos principales del proyecto son:

1. Determinar la sensibilidad de la detección de ctDNA-LCR para el diagnóstico de CLM.
2. Caracterizar las alteraciones genómicas presentes en el ctDNA-LCR y evaluar si esa información puede potencialmente guiar las decisiones terapéuticas y mejorar el tratamiento de la CLM.

Los objetivos específicos del proyecto son:

1. Aislar ctDNA-LCR de pacientes con diagnóstico definitivo o sospechoso mediante RM con contraste de gadolinio y/o clínica inequívoca de CLM.
2. Comparar la sensibilidad de la técnica de detección de ctDNA-LCR con la de la detección de células malignas en LCR (citología), utilizando la RM con contraste de gadolinio como gold standard.
3. Caracterizar las alteraciones genómicas en el ctDNA-LCR.
4. Determinar las alteraciones genómicas presentes en el tumor primario de mama, ctDNA en plasma y, si posible, en una muestra de otra localización metastásica, y comparar las alteraciones con las de ctDNA-LCR
5. Explorar si las alteraciones genómicas detectadas en el ctDNA-LCR pueden potencialmente guiar las decisiones terapéuticas

Metodología

1. Determinar la sensibilidad de la detección de ctDNA-LCR para el diagnóstico de CLM.

1.1. Aislar ctDNA-LCR de pacientes con diagnóstico definitivo o sospechoso mediante RM con contraste de gadolinio y/o clínica inequívoca de CLM

- Se obtendrán muestras de LCR de pacientes con CMM y sospecha clínica de CLM por RM con contraste de gadolinio y/o clínica inequívoca de CLM. Esta colección de LCR se hará como parte de la práctica clínica habitual para el diagnóstico de CLM.
- Se obtendrá una muestra adicional de 4-5mL de LCR para determinación de ctDNA, a través de punción lumbar o punción de reservorio de Ommaya previamente colocado
- Se aislará y cuantificará el ctDNA presente en el LCR (ver método abajo).

1.2. Comparar la sensibilidad de la técnica de detección de ctDNA-LCR con la de la detección de células malignas en LCR (citología), utilizando la RM con contraste de gadolinio como gold standard

- Una de las muestras de LCR será analizada en el Laboratorio de Citología, para identificación de células malignas;
- Si la primera muestra de LCR es negativa, se podrá repetir el procedimiento hasta 3 veces, como es estándar para el diagnóstico de CLM;
- Se determinará la sensibilidad de la técnica de detección de ctDNA- LCR y de la citología, utilizando la RM con contraste de gadolinio como gold standard en esta población;
- En aquellas pacientes con 3 determinaciones negativas consecutivas de células malignas en LCR, se podrá repetir la obtención de muestra de LCR posteriormente, para confirmación del diagnóstico y si la clínica y/o pruebas de imagen siguen siendo sugestivas;

- En la eventualidad de defunción, se realizará una autopsia para confirmar el diagnóstico de CLM en aquellas pacientes (y/o familias) que lo consientan.
2. Caracterizar las alteraciones genómicas presentes en el ctDNA-LCR y evaluar si esa información puede potencialmente guiar las decisiones terapéuticas y mejorar el tratamiento de la CLM
- 2.1. Caracterizar las alteraciones genómicas en el ctDNA-LCR
- El ctDNA-LCR será analizado por TagSequencing y PCR digital (ver método abajo).
- 2.2. Determinar las alteraciones genómicas presentes en el tumor primario de mama, ctDNA en plasma y, si posible, en una muestra de otra localización metástasis, e comparar las alteraciones con las de ctDNA-LCR
- Se recogerá y analizará una muestra de plasma para detección de ctDNA (ver método abajo);
 - La muestra de tumor primario de archivo y, si posible, una muestra de otra metástasis también se recogerán y analizarán
 - Se compararán las alteraciones genéticas presentes en las distintas localizaciones y en el ctDNA-LCR.
- 2.3. Explorar si las alteraciones genómicas detectadas en el ctDNA-LCR pueden potencialmente guiar las decisiones terapéuticas
- Los pacientes serán seguidos de modo prospectivo y se recogerán los datos relativos a los tratamientos recibidos;
 - Si se detecta una alteración genómica en ctDNA-LCR, se evaluará caso a caso la posibilidad de ofrecer un tratamiento dirigido contra dicha alteración. Las decisiones sobre el tratamiento siempre serán tomadas por el médico asistente de cada paciente;
 - Si un paciente recibe un tratamiento dirigido contra una alteración genómica detectada en el ctDNA-LCR, se le pedirá que acceda a realizar una colección de LCR aproximadamente cada 8 semanas tras inicio del tratamiento y en el momento de la progresión de enfermedad.

Muestras de pacientes

Este estudio se basa en la obtención de muestras, recogidas prospectivamente bajo aprobación Comité Ética, de tumor de mama, sangre y LCR en pacientes con cáncer de mama. A lo largo del presente proyecto se pretende analizar muestras de 20 pacientes.

De la sangre se separará el plasma de los linfocitos periféricos. Estos últimos se utilizarán como fuente de tejido normal para obtener la secuenciación del DNA de la línea germinal.

Los tumores serán analizados histopatológicamente. El historial clínico de los pacientes será estudiado.

El DNA de los tejidos tumorales se extraerá mediante el Kit DNeasyBlood&Tissue (Qiagen) siempre que se verifique que el porcentaje de tumor en la muestra es superior a un 70%. El ctDNA del LCR se extraerá utilizando el Kit QIAampCirculatingNucleicAcid (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante después de una doble centrifugación para eliminar el componente celular de la muestra. El DNA será cuantificado mediante el fluorómetroQubit.

Tag-Sequencing

Muestras de DNA de tumor de mama (tumor primario y/o metástasis), ctDNA (derivado de LCR) y linfocitos periféricos serán sometidos Tag-Sequencing. La secuenciación usando un panel con mutaciones específicas que se amplificaran los fragmentos que contienen dichas mutaciones. La Tag-sequencing consiste en la secuenciación masiva de fragmentos de DNA etiquetados mediante secuenciadores IlluminaHiSeq y MiSeq, presentes en VHIO.

Los datos de secuenciación se analizarán a través de algoritmos bioinformáticos.

PCR digital

Se realizara PCR digital en las mutaciones de CSF ctDNA detectadas por Tag- Sequencing utilizando QX200TMDropletDigitalTM PCR system (Bio-Rad) de acuerdo con los protocolos del fabricante y la literatura.

Consideraciones sobre tamaño muestral

Este es un estudio exploratorio, que pretende evaluar la sensibilidad de la detección de ctDNA-LCR para el diagnóstico de CML asociada a CMM. Por ese motivo, no hay cálculo formal de tamaño muestral. Se calcula que con la obtención de 20 muestras de LCR se consigan alcanzar los objetivos propuestos.

Número de pacientes: 20

PROCEDIMIENTOS ADICIONALES/DERIVADOS del estudio

Se pedirá a las participantes en el estudio que accedan a la colección adicional de 4- 5mL de LCR para determinación de ctDNA, respecto a lo obtenido por práctica estándar para diagnóstico de carcinomatosis leptomenígea.

Ley de Protección de Datos de Carácter Personal

De acuerdo con la Ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, los datos personales que se obtengan de las historias clínicas de las pacientes serán los necesarios para cubrir los fines del estudio, garantizando siempre la total discreción y máxima confidencialidad.

Para garantizar el anonimato de la identidad del paciente (asegurar que la información de las muestras de tumor o sangre no se relaciona con la identidad del paciente), las

muestras sólo irán identificadas con un código desde el momento mismo en que sean seleccionadas, no con el nombre del paciente. Sólo este código, y nunca la identidad del paciente, aparecerá donde figure la información clínica referida. La relación entre el código y la identidad quedará custodiada por personal autorizado del equipo investigador, y no será revelada a persona alguna salvo para cumplir con los fines del estudio. Así podemos asegurar que cualquier información que se obtenga a partir de las muestras biológicas permanecerá confidencial.

Las muestras biológicas se almacenarán en los laboratorios del Hospital Ramón y Cajal o del Hospital Vall d'Hebron. Aquellas muestras que se seleccionen serán anonimizadas y enviadas al Laboratorio de Genómica para su análisis.

En todo momento, se cumplirán los requisitos que establece el Artículo 59 de la Ley de Investigación Biomédica.

5. BIBLIOGRAFIA

Bibliografía más relevante sobre el tema

(1) Beauchesne, P. Intrathecal chemotherapy for treatment of leptomeningeal dissemination of metastatic tumours. *Lancet Oncol* 2010;11:871 -79.

(2) Wasserstrom WR, Glass JP, Posner JB. Diagnosis and treatment of leptomeningeal metastases from solid tumors: experience with 90 patients. *Cancer* 1982; 49: 759 – 72.

(3) Rudnicka, H., Niwinska, A., Murawska, M. Breast cancer leptomeningeal metastasis – the role of multimodality treatment. *J Neurooncol* 2007 Aug;84(1):57- 62. Epub 2007 Feb 20.

(4) Torrejón D, Oliveira M, Cortés J, et al. Implication of breast cancer phenotype for patients with leptomeningeal carcinomatosis. *Breast* 2013 Feb;22(1):19-23.

(5) Pavlidis N. The diagnostic and therapeutic management of leptomeningeal carcinomatosis. *Ann Oncol* 2004;15(Suppl 4):iv285-iv291.

(6) Shapiro WR, Posner JB, Ushio Y, Chemik NL, Young DF. Treatment of meningeal neoplasms. *Cancer Treat Rep* 1977; 61: 733 -743.

(7) Kaplan JG, DeSouza TG, Farkash A, et al. Leptomeningeal metastases: comparison of clinical features and laboratory data of solid tumors, lymphomas and leukemias. *J Neurooncol* 1990; 9: 225 -229.

(8) De Mattos-Arruda et al, internal data, submitted.

(9) De Mattos-Arruda L, Weigelt B, Cortes J, et al. Capturing intra-tumor genetic heterogeneity by de novo mutation profiling of circulating cell-free tumor DNA: a proof-of-principle. *Ann Oncol*. 2014 Sep;25(9):1729-35.

(10) De Mattos-Arruda L, Olmos D, Tabernero J: Prognostic and predictive roles for circulating biomarkers in gastrointestinal cancer. *Future Oncol* 7:1385-97, 2011.

(11) De Mattos-Arruda L, Cortes J, Santarpia L, et al: Circulating tumour cells and cell-free DNA as tools for managing breast cancer. *Nat Rev ClinOncol* 10:377-89, 2013.

(12) Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*. 2013 May 2;497(7447):108-12.

(13) Magbanua MJ, Melisko M, Roy R, et al. Molecular profiling of tumor cells in cerebrospinal fluid and matched primary tumors from metastatic breast cancer patients with leptomeningeal carcinomatosis. *Cancer Res*. 2013 Dec 1;73(23):7134- 43.

6. EQUIPO

INVESTIGADOR PRINCIPAL Y DIRECTOR DEL PROYECTO

Javier Cortés Castán

Categoría: Jefe de Sección de Cáncer de Mama y Tumores Ginecológicos

Servicio: Oncología

Área: Cáncer de Mama Metastásico

RESTO EQUIPO INVESTIGADOR

José Manuel Pérez, Fabricio Racca y Jesús Soberino

Centro IOB Institute of Oncology, Quiron Group

Esther Holgado y María Fernández-Abad

Centro: Hospital Ramon y Cajal

Joaquín Arribas, Mafalda Oliveira, Leticia de Mattos, Joan Seoane y Ana Vivancos

Centro: Vall d'Hebron Institute of Oncology

7. PRESUPUESTO

1. Gastos de Personal	Personal técnico de laboratorio	30.000 €
2. Gastos de Ejecución	A) Adquisición de bienes y contratación de servicios	60.000 €
	Reactivos para secuenciación y PCR Reactivos para obtención de muestras	10.000 €
	B) Gastos de Viajes Asistencia a congresos	5.000 €
	C) Gastos Indirectos y de Gestión Gastos indirectos asociados al proyecto	18.530 €
TOTAL PROYECTO		123.530 €