



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Evaluación de los niveles de DNA circulante en plasma
de pacientes con cáncer de mama por PCR digital**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Alexis Germán MURILLO CARRASCO

ASESOR

Margarita VELÁSQUEZ REINOSO

José Luis BULEJE SONO

Lima, Perú

2017

RESUMEN

Desde los años 50 se conoce la presencia del DNA circulante (*cell free-DNA*, *cfDNA*), originado por lisis celular en todos los órganos del cuerpo y producido en enfermedades degenerativas, tumores, infecciones o DNA fetal en gestantes. Una forma de analizar *cfDNAs*, es mediante la técnica de PCR digital (dPCR), que detecta el incremento del DNA de una célula distinta y minoritaria entre un bagaje de miles de células. El objetivo de la presente tesis es evaluar los niveles de *cfDNA* en plasma de pacientes con cáncer de mama para implementar una técnica de diagnóstico temprano. Se extrajo *cfDNA* de plasma proveniente de 16 pacientes (antes y después de la operación quirúrgica) y 21 controles, con el set MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation. Para la amplificación de fragmentos, se combinó master mix 1X (Applied Biosystems) y ensayos de detección por PCR de los genes PUM1 y RNasa P, con 1.5 µL de *cfDNA* de plasma en un volumen final de 15 µL que fue incluido en un chip por cada muestra. La PCR se realizó en un termociclador ProFlex™ (Applied Biosystems) siguiendo el programa pre-establecido por el fabricante, con una adición de cinco ciclos. Finalmente, se obtuvieron los datos de cuantificación con QuantStudio3D AnalysisSuite™ Cloud Software y fueron analizados usando el programa InfoStat 2015. Se encontraron diferencias significativas en los valores de *cfDNA* entre pacientes y controles para PUM1 ($p=0.0001$) y RNasa P ($p=0.0003$). Asimismo, se evaluó el soporte estadístico para el uso de marcadores en el diagnóstico mediante la curva ROC que favorece al marcador PUM1, con una sensibilidad del 75% y una especificidad del 95.2%; sin embargo, no se comprobó estadísticamente el descenso de niveles de *cfDNA* después de la operación, por lo que se recomienda un análisis de mayor cantidad de muestras para su confirmación o un tiempo mayor de la toma de muestra posterior a la operación. De esta forma, verificamos la utilidad de la PCR digital para la evaluación de DNA en bajas concentraciones.

Palabras clave: biopsia líquida, *PUM1*, *ribonucleasa P*, *cfDNA*, dPCR

ABSTRACT

Since the 1950s, the presence of circulating DNA (cell free-DNA, cfDNA), caused by cell lysis in all organs of the body and produced in degenerative diseases, tumors, infections or fetal DNA in pregnant women has been known. One way of analyzing cfDNAs is through the digital PCR technique (dPCR), which detects the increase of the DNA of a different cell among a baggage of thousands of cells. The aim of the present thesis is to evaluate the levels of cfDNA in plasma of patients with breast cancer to implement an early diagnostic technique. cfDNA from plasma was extracted from 16 patients (before and after the surgical operation) and 21 controls, with the MagMAX™ Cell Free DNA Isolation Kit. For amplification of fragments, master mix 1X (Applied Biosystems) and detection assays of the PUM1 and RNase P genes were combined with 1.5 µL of plasma cfDNA in a final volume of 15 µL that was included on a chip for each sample. PCR was performed on a ProFlex™ thermocycler (Applied Biosystems) following the program pre-established by the manufacturer, with addition of five cycles. Finally, quantification data were obtained with QuantStudio3D AnalysisSuite™ Cloud Software and analyzed using the InfoStat2015 program. Significant differences were found in the values of cfDNA between patients and controls for PUM1 ($p = 0.0001$) and RNase P ($p = 0.0003$). Statistical support for the use of markers in the diagnosis was also evaluated using the ROC curve that favors the PUM1 marker, with a sensitivity of 75% and a specificity of 95.2%; however, we did not statistically check the low level of cfDNA after the operation, so an analysis of more samples or major time of sample post-surgery for confirmation is recommended. In this way, we verified the usefulness of the digital PCR for the evaluation of DNA in low concentrations.

Keywords: liquid biopsy, *PUM1*, *ribonuclease P*, cfDNA, dPCR