



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



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Murillo, A. (2017). *Evaluación de los niveles de DNA circulante en plasma de pacientes con cáncer de mama por PCR digital*. Tesis para optar el título de Biólogo Genetista Biotecnólogo. Escuela Académico Profesional de Genética y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis es el resultado de la toma de muchas decisiones, algunas de ellas apoyadas en la experiencia de personas que estimo, a todas ellas; un expreso agradecimiento. En especial, a mis padres: Herlinda Carrasco y Richard Murillo, por aceptar el camino que inicié al elegir esta carrera; por aprender conmigo y enseñar con el ejemplo, por los consejos y por los regaños, por las alegrías y las penas compartidas, así como por todo eso que constituye el amor de padres.

Quisiera agradecer también a mi madrina y asesora, Blga. Margarita Velásquez, por los consejos brindados en mi formación académica y actual vida profesional. Asimismo, al MSc. Jaime Descailleaux y a todos con quienes compartí ambiente en el Laboratorio de Genética Humana, por enseñarme las distintas perspectivas y expectativas que la universidad brinda a sus formados. Al Dr. Álvaro Marcelo, por darme la confianza de iniciar un proyecto de investigación y enseñarme los pasos básicos en el trabajo de laboratorio.

A los amigos que hice en mi paso por el pregrado, por acompañarme de manera sincera y consecuente, aprendiendo de los errores y mejorando las fortalezas con el pasar de los años. A Michelle Christine, César Alexander, Pierina, Jonás, Yajahaira, Lina Rocío, Estephane, Manuel Junior, Stf, Henry, Melvi, Allisson y a muchos más que no alcanzarían en este espacio, pero prometo enviarles una copia de la presente redacción. Asimismo, a la Sra. Anita Mosqueira, la Blga. Madeley Aliaga, la Blga. Giannina Tineo y la Dra. Carla Mendez-Chacón del Laboratorio de Biomedicina Celular, Molecular y de Investigación del Hospital Guillermo Almenara por el apoyo a mi formación pre-profesional, por brindarme recursos y sugerencias para desarrollar aspectos de investigación y por acercarme al campo de la atención asistencial.

Precisamente, en el nexo afectivo y laboral que se establece en el trayecto académico-profesional, agradezco profundamente al Dr. Ricardo Fujita y a la Dra. Maria Luisa Guevara por recibirme y brindarme las condiciones pertinentes en el Centro de Genética y Biología Molecular de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres, sitio donde fue realizada la parte experimental de la tesis. Asimismo, agradezco a todo el equipo que trabaja ahí, por el soporte y los consejos que fueron de gran ayuda para la realización del presente trabajo; entre ellos, una gran estima y agradecimiento al Dr. José Luis Buleje por la experiencia incidida en la asesoría del proyecto y por el acompañamiento a lo largo del mismo. De la misma forma, al Mg. Óscar Acosta por su aporte en el análisis de resultados y por la franqueza de su actuar.

Uno de los agradecimientos finales a los que integran la División de Investigación Básica y Traslacional (Oncosalud-AUNA) por la valiosa colaboración desde la toma de muestra, el seguimiento de datos clínicos y la revisión de resultados. En especial, al Blgo. Joseph Pinto, la Blga. Jhajaira Araujo y al Mg. Claudio Flores por el aporte realizado en distintas fases del trabajo, desde la toma de muestra hasta el análisis de resultados.

Por último, agradezco al Financiamiento del Fondo para la Innovación, la Ciencia y la Tecnología (FINCyT), por subvencionar el proyecto PIAP-3-P-1021-14: "Test genético-epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos circulantes (cfNAs) como biomarcadores predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento", que me permitió desarrollar la presente tesis.

ABREVIATURAS

CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
cfDNA	DNA circulante
cfNA	Ácido nucleico circulante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dPCR	PCR digital
dsDNA	DNA de doble cadena
ECM	Exploración clínica de la mama
ER	Receptor de Estrógeno
HER2	Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal tipo 2
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PR	Receptor de Progesterona
PUM1	Homólogo de la proteína Pumilio 1 de <i>Drosophila melanogaster</i>
qPCR	PCR en tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa P	Ribonucleasa P
RPPH1	Componente H1 de la ribonucleasa P
ssDNA	DNA de cadena simple
tRNA	RNA de transferencia
UFR	Unidades de Fluorescencia Relativa

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	iv
ABREVIATURAS.....	vi
ÍNDICE GENERAL.....	vii
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Aspectos generales.....	4
2.2 Epidemiología del cáncer de mama en Perú.....	6
2.3 Diagnóstico del cáncer de mama.....	6
2.4 cfDNA en plasma.....	8
2.5 Métodos de extracción de cfDNA.....	9
2.6 Cuantificación de cfDNA.....	11
2.6.1 Cuantificación por espectrofotometría.....	13
2.6.2 Cuantificación por fluorometría.....	14
2.6.3 Cuantificación molecular de DNA.....	16
2.6.4 dPCR en la cuantificación de cfDNA.....	19
2.7 Genes de referencia.....	23
2.8 Algoritmo de cuantificación.....	29
III. HIPÓTESIS.....	32
3.1 Hipótesis.....	32
3.1.1 Hipótesis Estadísticas.....	32
IV. OBJETIVOS.....	33
4.1 Objetivo General.....	33
4.2 Objetivos Específicos.....	33
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
5.1 Tipo de investigación.....	34
5.2 Población.....	34
5.3 Materiales.....	34
5.3.1 Reactivos.....	34
5.3.2 Consumibles.....	35
5.3.3 Equipos.....	35
5.4 Métodos.....	36
5.4.1 Toma de muestra.....	36

5.4.2 Obtención de plasma	36
5.4.3 Estandarización de la extracción de cfDNA	37
5.4.4 Extracción de cfDNA.....	38
5.4.5 Estandarización del método de cuantificación.....	40
5.4.6 Cuantificación de cfDNA total.....	41
5.4.7 Integridad de cfDNA.....	41
5.4.8 Cuantificación por PCR digital.....	41
5.4.9 Análisis Estadístico	42
VI. RESULTADOS	44
5.1 Extracción de cfDNA	44
5.2 Integridad de cfDNA.....	46
5.3 Cuantificación de cfDNA.....	47
5.4 Cuantificación por fluorimetría.....	49
5.5 Cuantificación por dPCR	51
5.6 Comparación entre estadios oncológicos.....	55
5.7 Correlación entre cuantificaciones de cfDNA.....	56
VII. DISCUSIÓN	58
6.1 cfDNA como biomarcador	58
6.2 Sistemas de extracción de cfDNA.....	59
6.3 Sistemas de detección de cfDNA.....	60
6.4 Integridad de cfDNA.....	62
6.5 Aumento en los niveles de cfDNA.....	62
6.6 Niveles de cfDNA entre controles y pacientes.....	63
6.7 Niveles de cfDNA en pacientes pre y post-operatorio	64
6.8 Nivel de cfDNA en controles	66
VIII. CONCLUSIONES	67
IX. RECOMENDACIONES	68
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
XI. ANEXOS	81
ANEXO 1. Consentimiento informado y ficha de registro	81
ANEXO 2. Información clínica de pacientes	86
ANEXO 3. Descripción general de la población estudiada.....	87
ANEXO 4.Cálculo estadístico entre estadios oncológicos	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales tipos de cuantificación de ADN.	11
Figura 2. Evaluación de técnicas para cuantificar DNA.	13
Figura 3. Modelo de curva estándar para cuantificación de DNA.	15
Figura 4. Especificidad en la cuantificación de DNA.	17
Figura 5. Colorantes usados en la cuantificación de DNA.	18
Figura 6. Diferencias en las técnicas de cuantificación basadas en PCR.	21
Figura 7. Genes implicados en la formación de RNasa P.	24
Figura 8. Niveles de expresión de PUM1 en diferentes tipos de cáncer.	27
Figura 9. Red de asociación funcional de la proteína PUM1.	28
Figura 10. Fluorescencia captada en chip de cuantificación por dPCR.	30
Figura 11. Esquema de trabajo para la extracción de cfDNA con perlas magnéticas	39
Figura 12. Preparación de chips con muestra para cuantificación por dPCR.	43
Figura 13. Concentración de cfDNA según método de extracción.	45
Figura 14. Concentración de DNA obtenido en plasma y sangre total.	46
Figura 15. Corrida electroforética de cfDNA.	47
Figura 16. Eficiencia en la cuantificación de cfDNA.	49
Figura 17. Porcentaje de resultados cuantificados por fluorimetría.	50
Figura 18. Cuantificación de cfDNA con Qubit™ entre controles y pacientes.	51
Figura 19. Histogramas de valores de cuantificación de cfDNA.	52
Figura 20. Cuantificación de cfDNA por dPCR.	53
Figura 21. Curva ROC de los ensayos empleados en la dPCR.	54
Figura 22. Número de copias de cfDNA entre grupo control y estadios neoplásicos.	55
Figura 23. Correlación entre cuantificación Qubit y dPCR.	57
Figura A. Concentración de linfocitos y glucosa en función a la edad de las pacientes. ..	87
Figura B. Concentración de glucosa en función a la combinación de marcadores bioquímicos.	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadios de cáncer de mama según sistema	8
Tabla 2. Valores normales de cfDNA	23
Tabla 3. Estimación de la cuantificación por dPCR a través del cálculo manual.	31
Tabla 4. Resultado de cuantificación según plataforma.	48
Tabla A. Patrón de combinaciones entre las respuestas a marcadores bioquímicos.	88
Tabla B. Información clínica descriptiva de las pacientes participantes.	90

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

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama en mujeres es la neoplasia más común en el mundo, su incidencia es reportada de igual forma en países desarrollados así como en aquellos en vías de desarrollo. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS), señala que la mortalidad es ligeramente superior en países con menor ingreso per cápita, estimando medio millón de muertes en el 2011 (OMS, 2011).

En el Perú, el cáncer de mama es el segundo tipo de proliferación celular anormal encontrado en mujeres y el tercer tipo de cáncer con mayor morbilidad en el país (OMS, 2014), además, constituye el 19.6% de todos los casos de cáncer diagnosticados en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) durante el 2011.

De acuerdo a las cifras de la Liga contra el Cáncer, cada año aparecen 45000 nuevos casos de cáncer, de ellos, 5000 corresponden a cáncer de mama y la mayor parte de estos se encuentran en Lima y Arequipa; así mismo, se conoce que el 95% de casos de cáncer de mama detectados a tiempo, son curables a través de mejoras en las actividades cotidianas de cada individuo; sin embargo, el 85% de casos reportados en el Perú, son encontrados en estadios avanzados (Gestión, 2016). Esto complica el diagnóstico clínico y la decisión del médico para optar por un tratamiento contra la neoplasia; por esta razón, se promueven campañas de sensibilización y difusión de información entre la población, a fin de concientizar a los individuos sobre el impacto del cáncer en la sociedad.

Precisamente, la Liga contra el Cáncer es la primera institución del Perú encargada de realizar campañas de difusión, sensibilización y prevención para evitar un incremento en la prevalencia y mortalidad de la enfermedad, lo cual ha proveído de resultados favorables en los últimos años (Liga Cáncer, 2016). Así

como esta institución, recientemente se desarrollaron programas de apoyo a la comunidad; por ejemplo, el Ministerio de Salud (MINSA) diseñó el plan Esperanza en el 2012, dentro del Sistema Integral de Salud (SIS) para mejorar la atención integral del cáncer, a través de subvenciones en tratamientos antineoplásicos, paliativos, atención psicológica, herramientas de diagnóstico, detección temprana y promoción a la comunidad (MINSA, 2012).

De acuerdo a las memorias del INEN, la implementación del plan Esperanza permitió la atención de más de 27 mil pacientes en un año de funcionamiento, además de aumentar en 60% el número de casos nuevos tratados a través del SIS, debido principalmente a las campañas de difusión y diagnóstico que fueron realizadas en distintas localidades del país (INEN, 2013). En comparación a la cantidad de personas que son atendidas en servicios públicos, existen un bajo porcentaje de casos diagnosticados de forma privada. Oncosalud es una de las primeras empresas en el Perú dedicadas a la prevención, diagnóstico y tratamiento de cáncer que concentra un alto grupo de muestras del sector privado (Oncosalud 2017), conformado por 250 casos nuevos de cáncer de mama en el 2016, de los cuales 20% se encuentra en estadio tardío (Información brindada por Oncosalud, pendiente de publicación).

Iniciativas de este tipo apuestan por la detección temprana de cáncer para conducir a un mejor tratamiento y lograr la recuperación de los pacientes en menor tiempo, por ello, se sugiere el diseño de nuevas herramientas que permitan detectar la presencia de tumores de manera oportuna, ya que es la única forma de prevenir el desarrollo de neoplasias (Torres et al., 2013). Actualmente, las pruebas más utilizadas para la detección de cáncer de mama, involucran la exposición a radiación, a través del diagnóstico por imágenes. Considerando el riesgo adicional

que proveen estas herramientas, se propone el empleo de una técnica mínimamente invasiva, basada en una prueba de laboratorio a partir de una muestra de sangre periférica.

En los últimos años se ha descrito la presencia de DNA circulante en plasma (*cell free circulating DNA*, cfDNA) como un biomarcador del desarrollo temprano de cáncer en mama (Shaw et al., 2012; Dawson et al., 2013), colon (Mouliere et al., 2013) y pulmón (Oxnard et al., 2014). Debido a esta razón, resulta importante evaluar el nivel de cfDNA en pacientes con cáncer de mama, con el objetivo de asociar los resultados con datos referenciales que permitan emplearlo como un marcador molecular de temprana detección en nuestro país.

A fin de evaluar correctamente la carga de cfDNA en plasma, se precisa de métodos que proporcionen una alta sensibilidad y especificidad en la detección. Para ello, se ha considerado la PCR digital, tecnología basada en chips, capaz de cuantificar el número de copias presentes en una pequeña fracción de la muestra y reportar dichos valores de forma absoluta, mientras que la PCR en tiempo real (*quantitative PCR*, qPCR) expresa resultados basados en la comparación con un patrón de concentración.

En el país, existen pocos reportes que traten el diagnóstico de cáncer basado en la cuantificación de DNA (Huamán et al., 2008; Beltrán et al., 2009); sin embargo, estos no abordan estrictamente el cáncer de mama. Esta investigación pretende evaluar la cantidad de cfDNA en pacientes con cáncer de mama; analizando los niveles de PUM1 y Rnasa P de forma integral y absoluta, empleando la PCR digital que provee alta sensibilidad y reducido margen de error en la medición de estos genes asociados al proceso neoplásico en mención.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Aspectos generales

El cáncer de mama se inicia en los tejidos mamarios, existiendo 2 tipos principales: ductal y lobulillar. El cáncer ductal de mama inicia en los conductos que transportan la leche desde la mama al pezón y reporta mayor ocurrencia; mientras, el tipo lobulillar, se origina en regiones mamarias asociadas a la producción de leche, llamadas lobulillos (Siu, 2016). En algunos casos, puede presentarse una combinación de ambos tipos, conocida como subtipo “mixto” (Sociedad Americana del Cáncer 2016).

El cáncer de mama se origina espontáneamente en células que acumulan mutaciones asociadas a efectos metabólicos y resistencia a la apoptosis, que podrían ser adquiridas en los recurrentes periodos de división celular a partir de una célula madre (Wren, 2007). En estos casos, se agrega que una falla en genes de reparación y mantenimiento genómico podría desencadenar el efecto acumulativo de mutaciones, de éstos, un 10% puede deberse a factores genéticos del individuo, describiéndose entre 4 y 40 loci asociados (Michailidou et al., 2013; Garcia-Closas et al., 2013; Couch et al., 2013); a diferencia del cáncer de cérvix que es mayormente producido por los subtipos 16 y 18 del virus del papiloma humano (Augustus y Gabbur 2014).

Las células neoplásicas en cáncer de mama pueden diseminarse por la sangre o tejido linfático (Chen et al., 2013), lo que aumenta los tipos de muestra donde se pueden encontrar indicios para evaluar estadios tempranos de la enfermedad. Asimismo, es posible detectar el inicio de metástasis en función de los mismos biomarcadores en estadios avanzados de la enfermedad, que son expresados en tejido sanguíneo y linfático (Schito et al., 2012). Ello permitiría inferir un aumento

en la expresión génica de algunos loci que podrían ser considerados marcadores; así, en estudios caso-control se identificó una alta expresión de fibronectina y laminina a través del ensayo peroxidasa-antiperoxidasa (Bal de Kier et al., 1988), mientras que en un ensayo de cuantificación por qPCR se encontró aumento en la expresión de heparanasa (Theodoro et al., 2007), ambos eventos asociados a la migración por vía linfática de estas células tumorales.

Respecto a los estadios de cáncer de mama, se han reportado 2 sistemas que agrupan la morfología y características de los tumores; el primero, se basa en características como el tamaño del tumor, invasión del tejido anexo, posición en torno a los ganglios linfáticos y propagación hacia otros tejidos (Kiebert et al., 1991), mientras que el segundo propone una matriz de combinaciones a partir del tamaño del tumor (T), la afección de ganglios (G) y la ocurrencia de metástasis (M), donde para cada factor se le otorga un valor numérico en dependencia del daño presentado (Bartsch et al., 1989; Van Deurzen et al., 2008).

El primer sistema clasifica los casos de cáncer de mama en 4 estadios que se diferencian en el tamaño del tumor y la distribución de ganglios linfáticos afectados; adicionalmente, presenta el estadio 0, o carcinoma ductal *in situ* (CDIS) que hace referencia a un tipo de carcinoma que ocurre en el tejido conductual; es decir, el caso en el que la proliferación anormal de células, se inicia en el conducto lácteo y con poca frecuencia afecta al tejido mamario normal; sin embargo, puede constituir un daño potencial en una futura alteración del ciclo celular de estas células.

2.2 Epidemiología del cáncer de mama en Perú

De acuerdo al perfil oncológico diseñado por la Organización Mundial de la Salud (OMS 2014), el cáncer de mama es el segundo tipo de neoplasia con mayor incidencia en mujeres (aproximadamente 29%) y el tercero con mayor mortalidad (8.6%). Los factores de riesgo señalados para estas pacientes son el consumo total de alcohol y la obesidad, existe un registro a nivel nacional y monitoreo continuo ofrecido estatalmente (MINSA 2011).

La detección precoz de este tipo de cáncer es realizada generalmente a través de mamografía o exploración clínica de la mama (ECM). Una vez diagnosticado este tipo de cáncer, se puede brindar quimioterapia o realizar una operación quirúrgica y posteriormente se dispone el uso de morfina a nivel general; sin embargo, estos servicios no están disponibles totalmente en el sistema de salud público (OMS 2014).

2.3 Diagnóstico del cáncer de mama

Se han descrito diversas técnicas para estimar el grado de proliferación que presentan las células en cáncer de mama; así, se conoce la resonancia magnética, sonografía, mamografía y algunas pruebas bioquímicas (Álvarez et al., 2006; Houssami et al., 2008). Dichas técnicas terminan exponiendo el tejido oncológico a dosis de radiación que podrían agravar la situación inestable de las células. Igualmente, exámenes complementarios como el análisis bioquímico de sangre, pruebas de inmunohistoquímica, análisis de marcadores serológicos, análisis FISH, entre otros (Breast Cancer 2016) permiten caracterizar este tipo de cáncer y los estadios progresivos que determinan el tratamiento más adecuado.

La resonancia magnética es un examen por imágenes que utiliza imanes y ondas de radio para construir gráficos corporales, se pueden obtener docenas de imágenes a partir de un solo examen, sin necesidad de exponer el tejido a algún tipo de radiación, como es el caso de la mamografía que emplea rayos X de baja onda para determinar un mapa de detección al atravesar el seno. La sonografía es una prueba menos usada para el diagnóstico de cáncer de mama y utiliza ondas sonoras, las cuales son detectadas en distinta frecuencia y a partir de ahí, reportar alguna anomalía en la mama (Medline Plus 2016).

Actualmente, un punto tan importante como la detección de cáncer, es el correcto establecimiento del estadio; de esto depende que se pueda optar por un tratamiento adecuado y mejore la esperanza de vida de los pacientes (Liga contra el Cáncer 2016). Por ello, la Sociedad Americana del Cáncer recomienda el uso del sistema TNM para acreditar el estadio de la enfermedad (SAC 2017).

El sistema TNM está basado en tres puntos clave del desarrollo neoplásico: el tamaño del tumor (T), la infección de nodos linfáticos (N) y la metástasis a otros tejidos (M). De acuerdo a la progresión en cada grupo, se clasifican los 4 posibles estadios (I, II, III y IV) según se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Estadios de cáncer de mama según sistema TNM. Información recolectada de la Sociedad Americana del Cáncer (SAC 2017).

Estadio	TNM	Característica
IA	T1, N0, M0	Tumor de 2cm o menos (T1), sin invasión nodal (N0) ni metástasis (M0).
IB	T0 o T1, N0, M0	Tumor de 2cm o menos (T1) o no perceptible (T0), presenta 1-3 nodos linfáticos invadidos (N1), sin metástasis (M0).
IIA	T2, N0, M0	Tumor de 2-5cm (T2), sin invasión nodal (N0) ni metástasis (M0).
IIB	T2, N1, M0	Tumor de 2-5cm (T2), con invasión de 1-3 nodos linfáticos (N1), sin metástasis (M0).
	T3, N0, M0	Tumor mayor a 5cm (T3), sin invasión nodal (N0), ni metástasis (M0).
IIIA	T0-2, N2, M0	Tumor menor a 5cm o imperceptible, con invasión de 4-9 nodos linfáticos (N2), sin metástasis (M0).
	T3, N1-2, M0	Tumor mayor a 5cm (T3), con invasión de 1-9 nodos linfáticos, sin metástasis (M0).
IIIB	T4, N0-2, M0	Tumor con crecimiento epidermal (T4), con invasión de 0-9 nodos linfáticos, sin metástasis (M0).
IIIC	T0-4, N3, M0	Todos los tipos de tumor, con invasión de 10 o más nodos linfáticos (N3), sin metástasis (M0).
IIIV	T0-4, N0-3, M1	Todos los tipos de tumor, con invasión de otros tejidos lejanos a la mama (M1). Los sitios de recepción más comunes son los huesos, hígado, cerebro y pulmones.

El cfDNA en plasma involucra la presencia de ácidos nucleicos de forma extracelular en el torrente sanguíneo. Naturalmente, este material estuvo contenido en algún componente celular pero fue liberado espontáneamente o como consecuencia de un proceso canceroso. Dicha presencia ya había sido descrita en el siglo XX, donde la evaluación entre controles y pacientes con cáncer gástrico se hacía a partir de la longitud de estos fragmentos; sin embargo, era notoria la

diferencia significativa con los valores referenciales para individuos no afectados (Giacona et al., 1998).

La naturaleza del cfDNA supone que sus niveles pueden elevarse bajo múltiples condiciones clínicas que condicionen un aumento en la concentración de algún tipo celular que promueva la liberación de DNA; así, existen reportes que asocian un alto nivel de cfDNA con ciclo menstrual (Poelcher et al., 2010), obesidad (Nishimoto et al., 2016), falla cardíaca (Zaravinos et al., 2011), nefritis lúpica (Zhang et al., 2014), y otras enfermedades no cancerosas (Spindler et al., 2014). Entre estos casos, existen diferencias en los valores estadísticos reportados en la diferenciación intergrupar, lo que deriva en la necesidad de un análisis específico que involucre marcadores asociados a cada patología.

2.5 Métodos de extracción de cfDNA

Los cfNAs pueden ser capturados, extraídos o purificados; al igual que aquellos provenientes de linfocitos; sin embargo, la técnica elegida depende del tipo de muestra empleada. Como se conoce, el plasma presenta una elevada concentración de proteínas y otros elementos, en dependencia del estilo de vida de la persona (Fredrikson et al., 2004); por esta razón, los ácidos nucleicos están expuestos a un mayor daño, frente al cual deben considerarse métodos de extracción con estrategias que permitan capturar y separar específicamente el DNA.

Los métodos más conocidos para extraer DNA, incluyen la extracción a través de consecuentes reacciones químicas, modificaciones del método *salting-out* (Miller et al., 1988), la purificación por columnas o la captación del ácido nucleico con perlas magnéticas.

Algunos trabajos realizados con cfDNA, emplean el método de separación química y obtienen resultados que permiten comparar pacientes afectados con cáncer, controles, e incluso pacientes después de la operación (Xue et al., 2009; Kim et al., 2014); sin embargo, esta extracción puede adicionar mayores complicaciones en la realización de la reacción en cadena de la polimerasa por contaminación, sin contar el hecho que el procedimiento y la calidad de los resultados es afectado en gran parte por el factor humano a través de la manipulación (Howe et al., 1997).

Otros autores deciden apostar por la extracción de ácidos nucleicos mediada por sets comerciales, empleando aquellos que ofrecen la extracción y purificación de muestras por columnas. Así, han conseguido separar cfDNA en plasma de pacientes con cáncer de mama, colon, ovario, entre otros; reportando resultados basados en tecnologías cuantitativas de PCR para evaluar el número de copias de regiones específicas y elegidas previamente (Kamat et al., 2006; Boni et al., 2007; Dawson et al., 2013; Mouliere et al., 2013; Oxnard et al., 2014). Aunque debemos considerar que la mayoría de estos trabajos son realizados con la participación de pacientes que presentan estadios avanzados de la enfermedad, por este motivo, pueden presentar mutaciones concordantes entre DNA tumoral y cfDNA en plasma. Es así que el estudio de cfDNA en fluidos, abre paso a los trabajos en DNA de tumor circulante (*circulating tumor DNA, ctDNA*).

La presente investigación propone evidencia para justificar el empleo de cfDNA en la determinación de estadios tempranos de cáncer de mama, así como en la diferenciación entre controles y pacientes, en ese sentido, se necesita un método eficiente para la extracción total de cfNAs. Para ello, se emplean perlas magnéticas, las cuales han sido usadas en otros estudios de detección temprana

(Hyun et al., 2016), así como también, en la evaluación de DNA fetal (Sparks et al., 2012).

2.6 Cuantificación de cfDNA

El cfDNA puede ser cuantificado de forma total o específica (Figura 1). En el primer caso, es cuantificado a través de la cantidad de luz que es absorbida por la muestra a evaluar o por el volumen de emisión luminosa de un agente intercalante; mientras que la cuantificación específica obtiene su valor por medio de la amplificación y detección de regiones establecidas por oligonucleótidos de hibridación específica (cebadores o iniciadores), esta cuantificación puede ser relativa o absoluta (English et al., 2006).

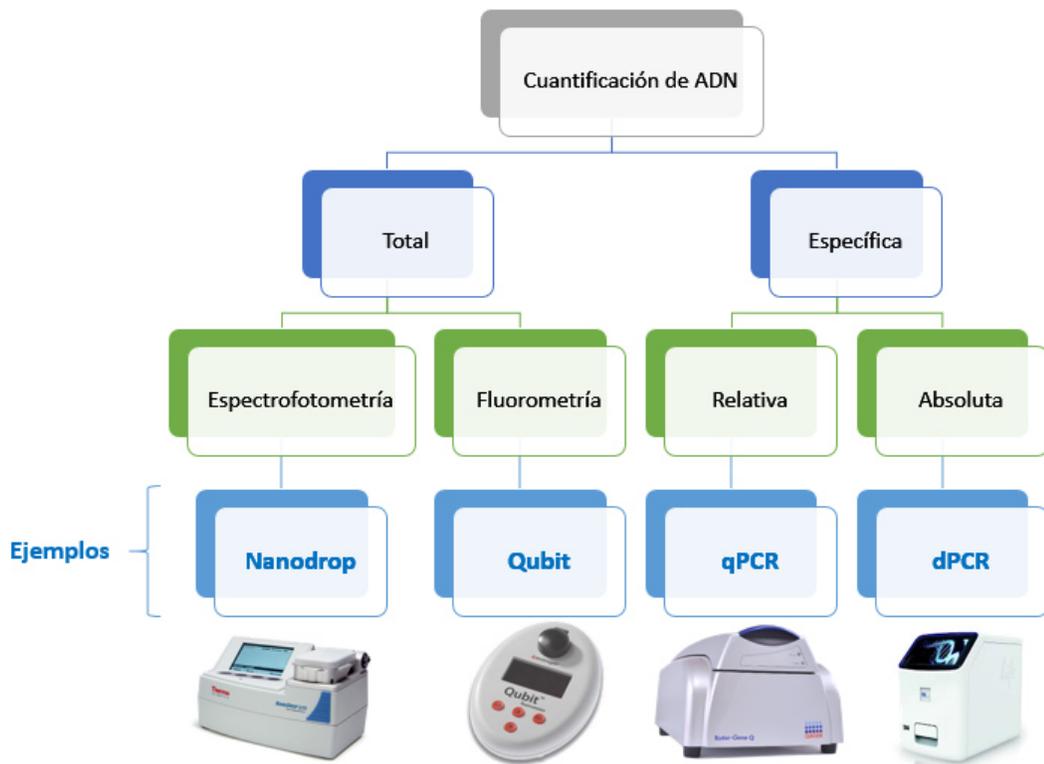


Figura 1. Principales tipos de cuantificación de DNA. Se muestran algunos de los equipos más utilizados según el enfoque: Nanodrop Lite (espectrofotometría), Qubit™ (fluorometría), QuantStudio 3D™ (dPCR) y Rotor-gene Q (qPCR).

Cabe mencionar que existe más de una plataforma habilitada para cada tipo de cuantificación de DNA, evidentemente la sensibilidad y especificidad de las técnicas varían y de ellas depende su aplicación. Precisamente, se ha reportado que las técnicas basadas en fluorimetría pueden ser más específicas pero menos sensibles en relación a aquellas basadas en espectrofotometría (English et al., 2006); sin embargo, estas técnicas requieren un paso adicional de preparación de ácidos nucleicos, lo que puede volverse un proceso engorroso cuando se trabajan muchas muestras de forma rutinaria. En estos casos, se emplea la espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy*, ICP-OES) como patrón de oro para la comparación apropiada de resultados. Esta técnica divide e ioniza el analito formando espectros de emisión atómica que son posteriormente analizados en un sistema informático (ICP-OES 2017). En la Figura 2, se muestra una comparación de 4 técnicas para cuantificar DNA (2 basadas en espectrofotometría y 2 en fluorimetría), con las cuales se midió la concentración de DNA a 52.75 ng/μL (determinado por ICP-OES) y se obtuvo resultados confiables en las plataformas que evalúan la emisión de fluorescencia de ácidos nucleicos.

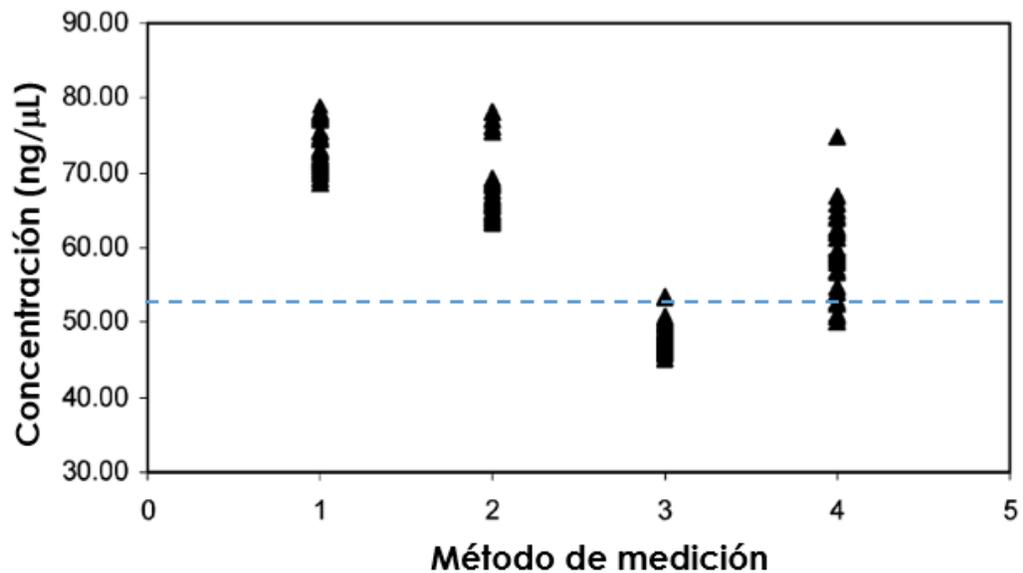


Figura 2. Evaluación de técnicas para cuantificar DNA. (1) Espectrofotómetro U-2000, (2) Espectrofotómetro Nanodrop-1000, (3) Colorante fluorogénico PicoGreen, (4) Colorante fluorescente Quant-it. En cada técnica se realizaron 6 mediciones de un grupo de 6 muestras a la misma concentración, se presentan todos los resultados obtenidos y en azul, el nivel de DNA de las muestras reportado por ICP-OES. Tomado y modificado del trabajo de English y colaboradores (2006).

2.6.1 Cuantificación por espectrofotometría

Es posible estimar la cantidad de ácidos nucleicos presentes en cierto volumen en función a la cantidad de luz que es absorbida por el analito; este método emplea la proyección de un haz de luz a diferentes longitudes de onda (230, 260 y 280 nm), el cual es captado por los ácidos nucleicos, transmitiendo un residuo luminoso medible por un detector al final de cada canal.

De esta forma, se obtiene la cantidad de cfDNA en función al valor de absorbancia obtenido por pequeñas cantidades de volumen, para validar estos datos se requiere una calibración con controles negativos (ausencia de DNA) en cada medición; sin embargo, esta medición no es precisa para el DNA presente en la muestra, ya que pueden quedar componentes del

proceso de extracción que también absorben luz y alteren los resultados; por ello, también se consideran las relaciones entre las mediciones a distintas longitudes de onda para estimar la concentración. En ese sentido, la relaciones 260/230 y 260/280 son indicadores de la pureza de la muestra, debido a que otros residuos de la extracción de DNA (alcohol o proteínas, principalmente) pueden contaminarla y generar complicaciones en la amplificación por PCR; un caso muy conocido de este tipo se encuentra en las muestras forenses (Nicklas y Buel, 2003), así como en aquellas provenientes de tumores en parafina (Heredia et al., 2013).

Asimismo, este sistema de medición no hace diferencia entre los tipos de ácidos nucleicos, debido a que todos ellos absorben luz a la misma longitud de onda (260 nm). En estos casos, la diferencia de cuantificación radica en un factor de conversión que depende del tipo de ácido nucleico: DNA de doble cadena (dsDNA), DNA de cadena simple (ssDNA) o RNA.

Este factor de conversión es reemplazado en la ecuación de Lambert-Beer: $A = \epsilon bc$, donde ϵ es el coeficiente molar; b, la longitud de la celda; c, la concentración y A, la absorbancia reportada. Considerando que la longitud de la celda es constante, el coeficiente molar de dsDNA es de 0.02 $\mu\text{L}/(\text{ng}\cdot\text{cm})$, esto significa que 1 Abs a 260 nm corresponde a una concentración de 50ng/ μL de dsDNA (Thermo Scientific, 2017b).

2.6.2 Cuantificación por fluorometría

El empleo de fluoróforos para cuantificar DNA ofrece un cálculo de la concentración de forma más segura y confiable, debido a que estas moléculas emiten luz solo cuando se encuentran intercaladas en el

componente a cuantificar. Esta especificidad es debida a que el agente fluorescente es capaz de reconocer dsDNA, ssDNA, RNA y proteínas de forma independiente.

Para lograr una correcta medición de DNA, el equipo diseñado para este fin debe ser calibrado con muestras a diferentes concentraciones, las cuales remarcan el espectro de medición del sistema y permiten construir la curva estándar (Figura 3).

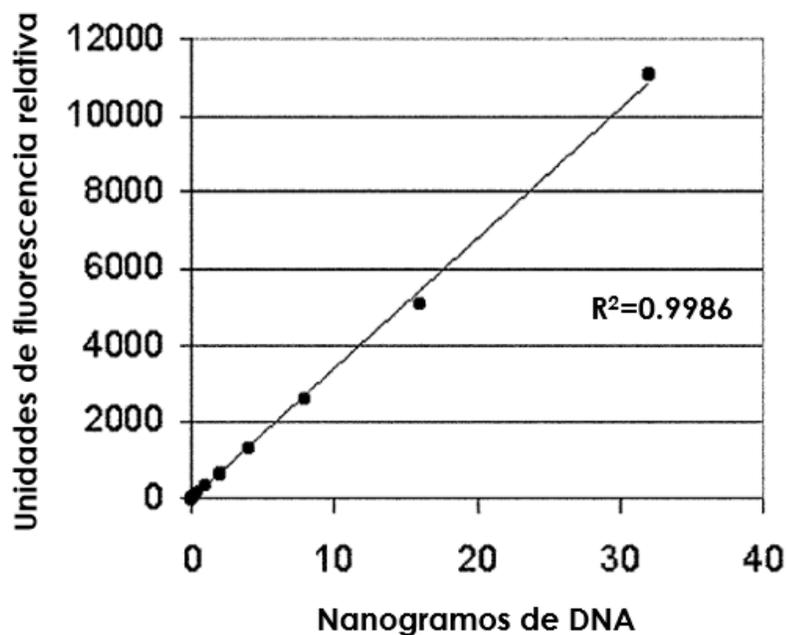


Figura 3. Modelo de curva estándar para cuantificación de DNA. Se muestra el coeficiente de correlación entre las concentraciones determinadas para cada muestra y la fluorescencia del colorante PicoGreen. Tomado y modificado del trabajo de Nicklas y Buel (2003).

La formación de la curva estándar o patrón permite evaluar las cualidades del equipo y establecer una referencia de concentraciones reales con las unidades de fluorescencias que son interpretadas por el equipo. Este proceso está restringido a la evaluación estadística de los puntos medidos, cuyo valor está expresado por el coeficiente de correlación (R^2) que indica la

eficiencia del proceso, a través de una valoración entre 0 y 1 donde los valores más cercanos a 1 son los más aceptables (Gallagher y Desjardins, 2007).

2.6.3 Cuantificación molecular de DNA

Los métodos de cuantificación previamente expuestos aportan información de manera sencilla y facilitan la obtención de las concentraciones en el manejo de muestras a gran escala; sin embargo, presentan problemas en dos aspectos muy importantes en el análisis de DNA: sensibilidad y especificidad.

En el diagnóstico de cáncer se precisa una cuantificación con alta eficiencia en la determinación del número de copias genómicas presentes, por mínimo que sea este valor. Asimismo, es necesario asegurar que el ácido nucleico cuantificado pertenece al genoma humano, diferenciando los aportes a nivel de nucleótidos producidos por agentes infecciosos, como virus y bacterias.

En la representación de la Figura 4 se observa el posible efecto de la especificidad en la cuantificación de DNA extraído. En esos casos, se observa que la presencia de residuos proteicos o alcohol, pueden alterar la absorbancia a 260 nm y con esto, aumentar el valor que reporta el equipo de espectrofotometría. En el caso de la fluorometría inespecífica, la medición se realiza a través de la unión de un agente al dsDNA, sin embargo, éste puede tener un origen distinto al humano, por ejemplo en presencia infecciones virales o bacterianas. Es así que las cuantificaciones mediadas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ofrecen como una buena opción para asegurar la especificidad respecto al origen de las secuencias y

una sensibilidad para obtener valores confiables de concentración que luego puedan ser comparados entre los grupos participantes. Esta cuantificación se realiza a partir de la detección de fluoróforos, que son moléculas capaces de emitir fluorescencia en relación a su interacción con el DNA, estos pueden ser inespecíficos, como SYBR Green, o específicos, como las sondas Taqman.

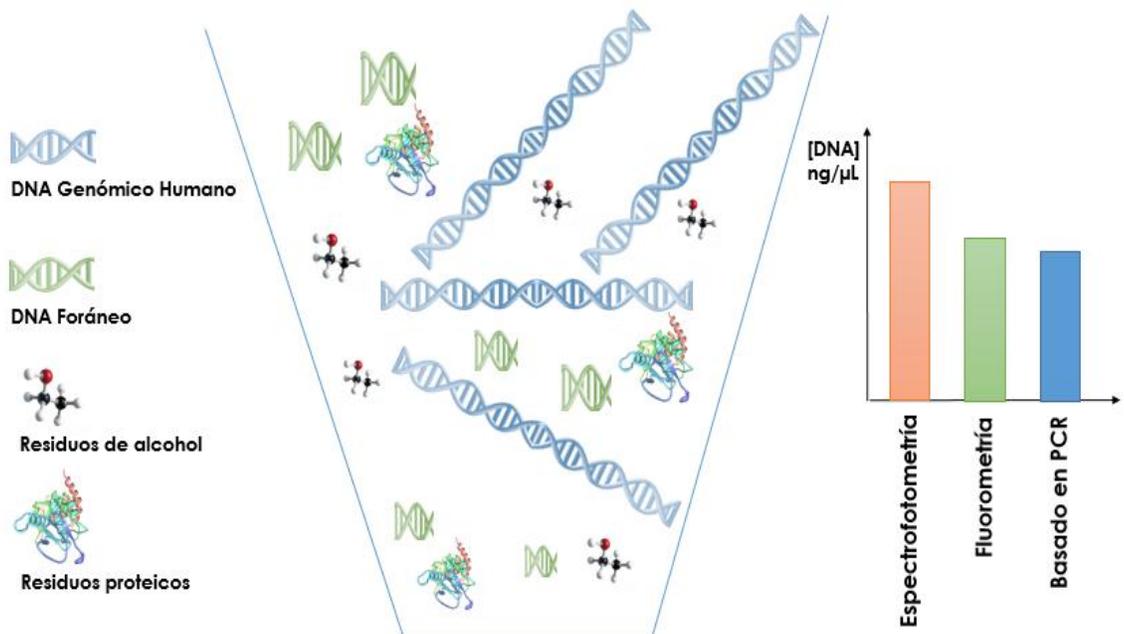


Figura 4. Especificidad en la cuantificación de DNA. Considerando la diversidad de componentes que pueden permanecer en el tubo de elución, se tienen distintos resultados en las pruebas de cuantificación. Se muestra una disminución de la concentración de DNA en relación a la especificidad de la técnica empleada.

El fluoróforo inespecífico emite luminosidad desde el momento que interactúa con dsDNA, sin importar su composición nucleotídica y se reporta empleando únicamente un canal de detección (520 nm). Mientras, las sondas Taqman incluyen una secuencia específica la cual necesita hibridar

separar el apagador (*quencher*) del fluoróforo y que éste emita la fluorescencia (Nicklas y Buel, 2003). La especificidad de este método permite incluir más de una sonda en cada reacción, detectable por más de 1 canal. Los colorantes más conocidos son FAM, VIC, HEX, TET, ROX, JOE y TAMRA (Figura 5).

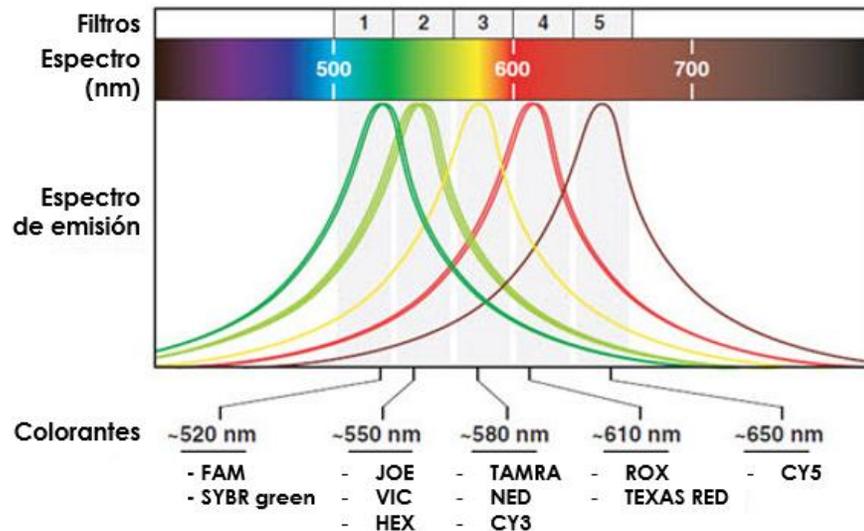


Figura 5. Colorantes usados en la cuantificación de DNA. Se conocen diversos fluoróforos que son detectados en 5 canales o filtros principales a diferentes longitudes de onda. Tomado y modificado de la página web de Thermo Scientific (2017a).

La qPCR, aporta valores de cuantificación a partir de la fluorescencia emitida en los tubos de reacción, dicha medición se realiza en cada ciclo de amplificación y reportar estos datos en un sistema de análisis informático, el cual compara estos valores con referencias de concentración conocida, a través de la curva estándar. Sin embargo, una desventaja de la técnica se presenta por la posible alteración del valor de cfDNA por el material nuclear que puede ser liberado desde los linfocitos hacia el torrente sanguíneo. En ese sentido, para evitar un falso diagnóstico, se opta por coleccionar la muestra

sanguínea en tubos que además del anticoagulante, contengan estabilizadores de dichas células, evitando así la permeabilidad de su membrana y consecuente lisis (Norton et al., 2013).

La dPCR representa un sistema de cuantificación absoluta de las copias de DNA encontradas en la muestra, las cuales son repartidas en micropocillos y amplificadas en una PCR independiente. Esto aporta la alta sensibilidad y precisión que caracteriza la técnica, logrando determinar el nivel de DNA sin necesidad de una curva estándar (a diferencia del qPCR). Esta tecnología es aplicable a objetivos con baja concentración en muestra, como la presencia de DNA en plasma humano, por lo que resulta idónea su utilización en este trabajo.

Con el desarrollo del PCR digital, se establece una mayor sensibilidad en las pruebas moleculares. Dicha tecnología ha sido usada en los últimos años para reportar asociaciones entre expresión génica y enfermedades metabólicas (Takeuchi et al., 2005; Tozawa et al., 2007; García et al., 2015), infecciosas (Kalisky y Quake, 2011; Kinugasa et al., 2015), y cancerosas (Yung et al., 2009; Wang et al., 2010; Taly et al., 2013; Heredia et al., 2013).

2.6.4 dPCR en la cuantificación de cfDNA

El cfDNA en fluidos es empleado en el estudio del cáncer desde el siglo pasado, siendo uno de los primeros trabajos el realizado por Giacona y colaboradores (1998), el cual demostró diferencias significativas en la longitud de fragmentos de cfDNA entre pacientes con cáncer pancreático y controles. Desde entonces, estos estudios han mejorado sus resultados con la aplicación de técnicas modernas con mayor resolución.

Los sistemas de cuantificación basados en PCR son los más usados en el análisis diagnóstico y pronóstico de cáncer, así como en la evaluación de tratamiento farmacológico y efecto quirúrgico (Kamat et al., 2006; Boni et al., 2007; Hindson et al., 2011; Dawson et al., 2013).

Estos sistemas se diferencian en la forma que cuantifican los ácidos nucleicos y de manera consecuente, las unidades en las que expresan estos valores. Así, la qPCR aporta valores de cuantificación a partir de la comparación con los datos de la curva estándar; sin embargo, las curvas dependen del diseño experimental, así como de la región a evaluar. Por estas razones, la qPCR expresa la cuantificación en unidades internacionales o equivalentes de genoma (*Genome Equivalents, GE*) por microlitro de muestra evaluada.

Por otro lado, la PCR digital emplea un sistema de amplificación en punto final, esto significa que la fluorescencia es medida al final de la amplificación. El propósito de la dPCR es amplificar todas y cada una de las copias presentes en el mix evaluado, lo que no está asegurado en la qPCR y explica que copias mutantes de DNA en baja concentración no sean detectadas. Además, la dPCR no precisa de una curva de calibración o estándar, lo que facilita el acceso a los resultados y permite expresar los valores en copias por microlitro (Whale et al., 2012).

Como se observa en la Figura 6, la dPCR en chips optimiza la dispersión de cada muestra, asegurando la amplificación y detección independiente, rescatando de esta forma todas las secuencias presentes en el mix; en contraposición, la qPCR es realizada directamente en el tubo y la fluorescencia emitida es el resultado del conjunto de copias de DNA que son

amplificadas. La principal diferencia entre dPCR y qPCR radica en la forma que establece la medición de DNA a partir del número de pocillos amplificados o la cantidad de fluorescencia emitida, respectivamente.

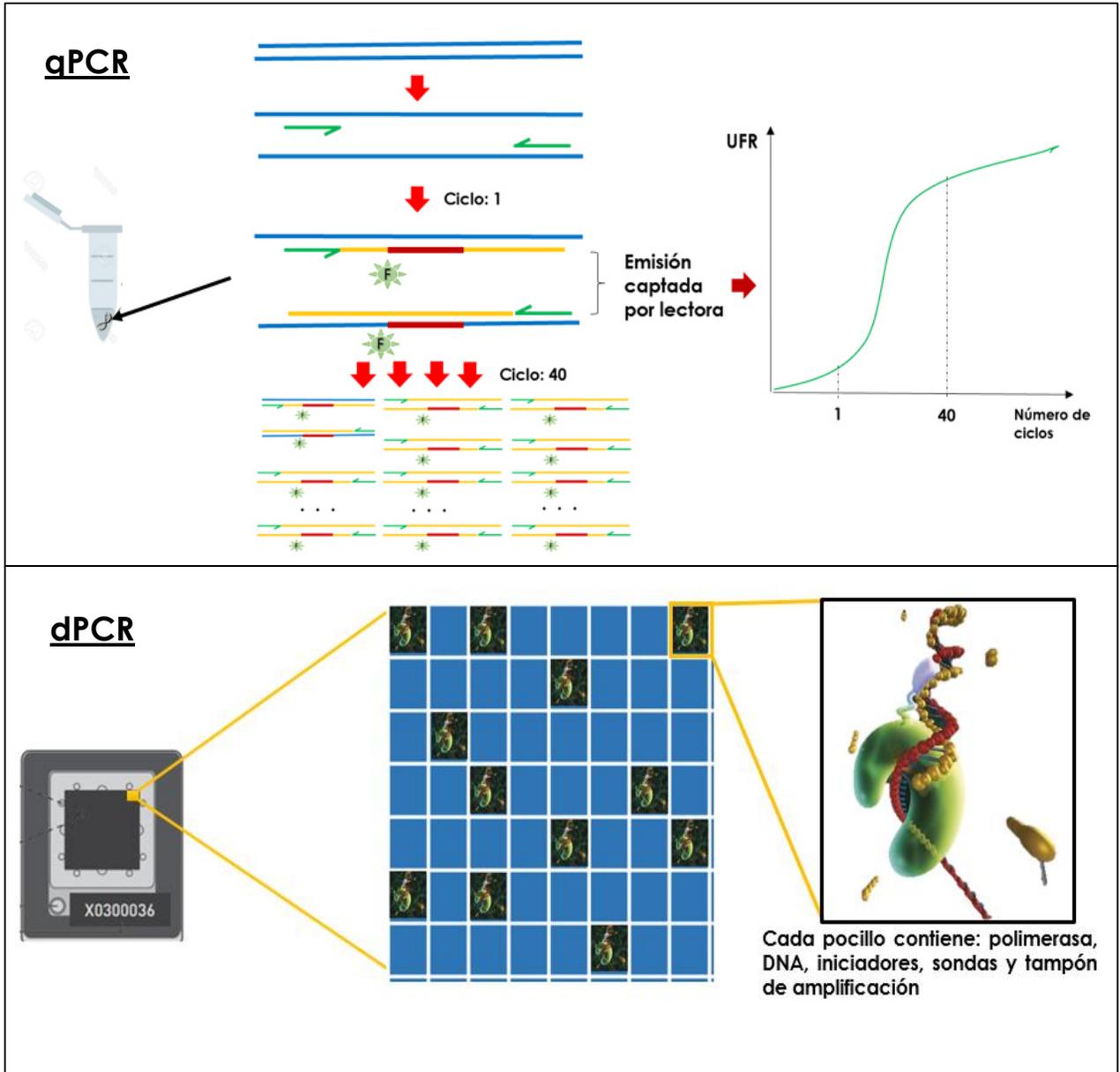


Figura 6. Diferencias en las técnicas de cuantificación basadas en PCR. La qPCR (arriba) consiste en una amplificación de todas las copias presentes en el tubo, donde la emisión luminosa es captada en cada ciclo y reportada en unidades de fluorescencia relativa (UFR). La dPCR (abajo) distribuye el volumen de amplificación en pocillos donde se amplifica independientemente cada copia y la cuantificación se realiza por conteo de aquellos pocillos con fluorescencia detectable.

La dPCR cuenta con un canal de referencia (ROX) donde se evidencia la cantidad de pocillos que fueron ocupados y emplea dos canales adicionales (VIC y FAM) para determinar aquellas posiciones donde ocurrió amplificación de ácidos nucleicos; entonces, realiza la medición por conteo de pocillos fluorescentes, estableciendo el número de copias encontrado por cada microlitro de muestra evaluada. Mientras, la qPCR emplea canales similares (VIC y FAM) para estimar las unidades de fluorescencia emitidas y compararlas con la curva estándar; es decir, para cuantificar con qPCR se precisa de un experimento previo en el cual se colocan muestras de concentración conocida a fin de establecer la proporción entre unidades de fluorescencia relativa y la concentración de ácidos nucleicos. Por este motivo se indica que la cuantificación obtenida por qPCR es específica pero relativa a la curva estándar, mientras que la dPCR provee de una medición absoluta del nivel de DNA presente en una muestra (Thermo Scientific 2017a).

En líneas generales, se han descrito diversos métodos para extraer y cuantificar cfDNA, de tal forma que no se encuentra un consenso entre estos datos. Algunos puntos de referencia son mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2. Valores normales de cfDNA, según autor y método de obtención

Referencia	Método de Extracción	Método de Cuantificación	Valor límite (ng/mL)	Valor promedio (ng/mL)
Zhang et al., 2014	Purificación por centrifugación	Fluorometría	ND	200
Gould et al., 2014	Purificación por columnas	Espectrofotometría	1000	ND
Poelcher et al., 2010	Purificación por columnas	qPCR	14	ND
Nishimoto et al., 2016	Purificación por columnas	Fluorometría	15	ND
Spindler et al., 2014	Purificación por columnas	qPCR	ND	6.7

ND=No disponible

2.7 Genes de referencia

Con el descubrimiento del cfDNA, se inició la búsqueda de marcadores estables para este tipo de ácidos nucleicos. Con esa finalidad, se analizó el efecto del desarrollo neoplásico en los niveles de expresión de RNA en distintos órganos, como ovario (Kamat et al., 2006), mama (Zhong et al., 2007) o recto (Boni et al., 2007), donde emplearon genes referenciales como GAPDH, b-actina y b-globina o los que codifican subunidades de ribonucleasa P (RNasa P) para evaluar sus niveles de expresión, encontrando diferencias significativas ($p < 0.05$) entre personas afectadas y el grupo control.

Así, RNasa P es una enzima que activa el RNA de transferencia (tRNA) favoreciendo el proceso de traducción de RNA a proteínas, dicha ribonucleasa está compuesta por 10 proteínas y una región de RNA (componente H1) para reconocimiento (Figura 7). Las subunidades empleadas en su formación son codificadas por genes independientes ubicados en 9 cromosomas diferentes, por ejemplo, el componente H1 parte del gen RPPH1 que está ubicado en el cromosoma 14 (OMIM 2016). Estas regiones ofrecen distintas alternativas y funciones de detección, por lo que son evaluadas a fin de hallar la que ofrezca mejores resultados en la especificidad y sensibilidad con la que determinan el límite entre el grupo de controles y pacientes o en los estadios pre y postoperatorio, de acuerdo a lo descrito previamente.

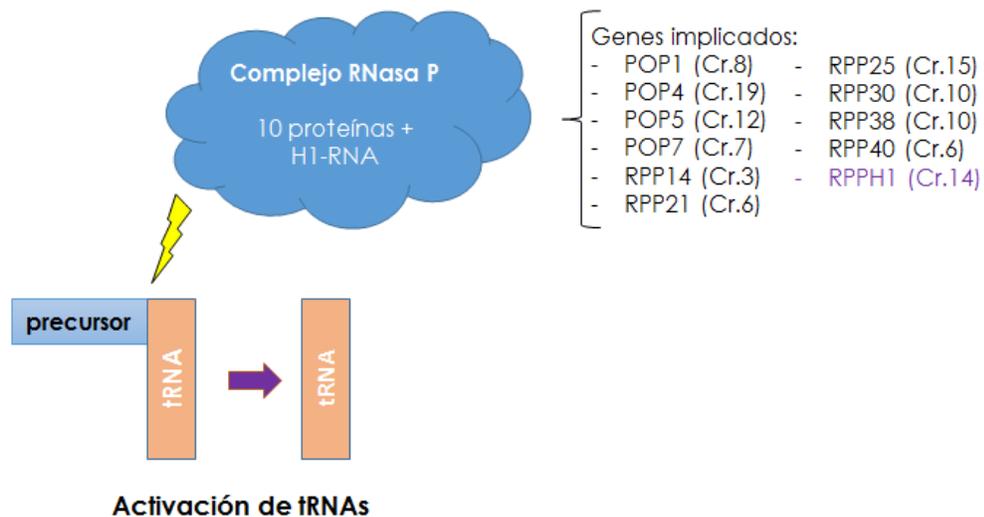


Figura 7. Genes implicados en la formación de RNasa P. El complejo enzimático que activa tRNAs está formado por los productos de 11 genes, entre paréntesis se indica el cromosoma de procedencia en cada caso. El gen que produce el componente H1 (RPPH1) es blanco de cuantificación y se muestra en color morado.

Precisamente, los genes que codifican la ribonucleasa P son marcadores moleculares empleados en estudios de cáncer, debido a que esta enzima tiene como función la hidrólisis de pre-RNA que deriva en tRNA; en casos de proliferación celular, se ha descrito un mayor número de copias de este gen, un

efecto asociado también a la aparición de pseudogenes, como resultado de las actividades mutacionales en distintos tipos de cáncer (Billi 2002).

Se han reportado interacciones de esta enzima con otros marcadores, por ejemplo algunos RNA de gran tamaño (lncRNA), como MALAT1 que son indicadores de metástasis. Esto sugiere que la ribonucleasa es sobreexpresada desde los primeros estadios de proliferación celular descontrolada, hasta la invasión de nuevos tejidos por metástasis (Gutschner et al., 2013). A nivel genético, las secuencias asociadas a RNasa P son blanco de metilaciones que pueden ser analizadas por separado mediante la adición de bisulfito en un secuenciamiento alterno para normalizar el número de copias de otros genes relacionados (Walter et al., 2012).

Por ello, RNasa P se ha convertido en un punto de referencia para múltiples investigaciones en cuantificación de DNA y expresión de RNA en distintos tipos de cáncer (Hindson et al., 2011; Chen et al., 2012). Sin embargo, también existen marcadores moleculares que son detectados en tipos específicos de cáncer, ese es el caso de PUM1, que ha sido reconocido como el gen de referencia más estable en cáncer de mama. Este gen produce un homólogo de la proteína Pumilio 1 de *Drosophila sp.*, que también ha sido caracterizado en relación al gen que produce la proteína ribosomal L13 (RPL13A) constituyendo un fuerte marcador específico para cáncer de mama (Kılıç et al., 2014). Un resultado similar es obtenido con los genes que codifican para la proteína ribosomal larga P0 (RPLP0) y la proteína de unión a la caja TATA (TBP) en un estudio de expresión y normalización por RT-PCR. En este caso, debemos considerar que los genes y productos asociados a PUM1, controlan funciones clásicas para el desarrollo de la transcripción y traducción de múltiples proteínas, por lo que sus niveles podrían

mostrar diferencias debidas a errores en los procesos mencionados, los cuales no dependen necesariamente del evento canceroso, pero pueden actuar como un agente en la relación causa efecto, donde la direccionalidad no queda determinada (Lyng et al., 2008).

La estabilidad en la expresión de PUM1 no es verificable para otros tipos de cáncer. Cerca del 82% de pacientes con cáncer de mama evaluados presentan una expresión normal de la proteína en comparación con otros tipos de cáncer como hígado (17%) o riñón (27%), de acuerdo a lo indicado por el Atlas Humano de Proteínas (Figura 8). Entonces, la presencia de un alto número de copias de PUM1 en muestras cuya carga total de DNA no pueda diferenciarse entre pacientes y controles, podría deberse a la función que desarrolle la proteína traducida a partir de la información genética.

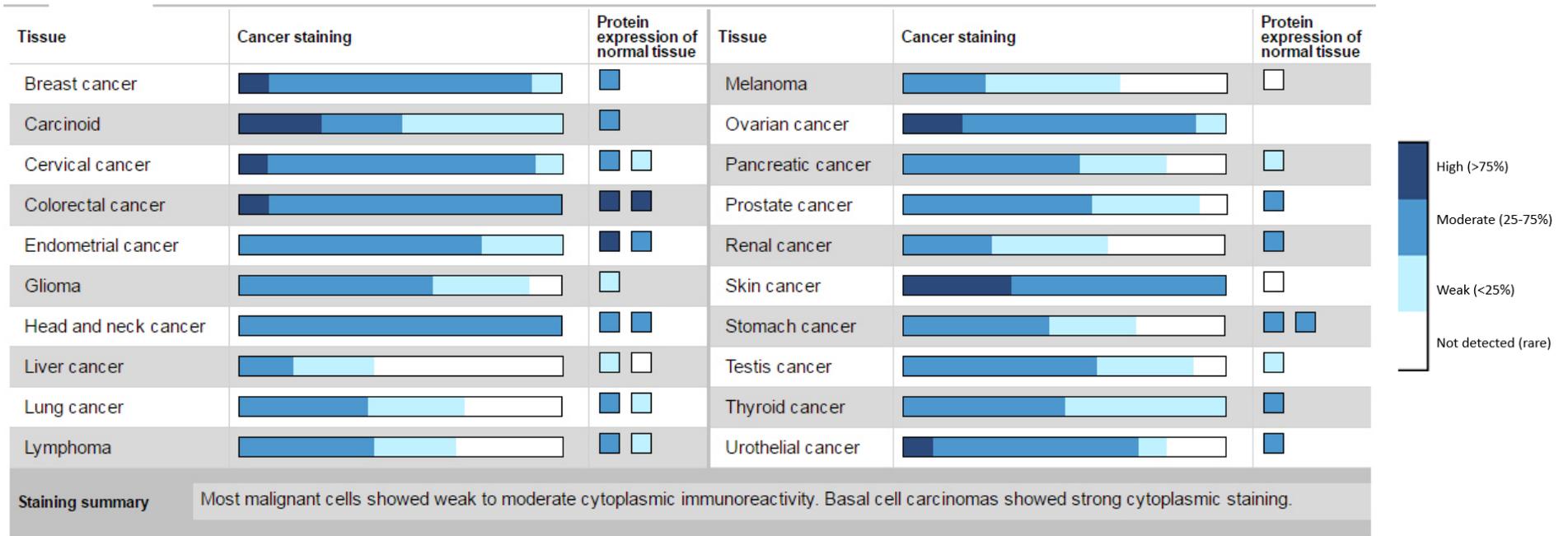


Figura 8. Niveles de expresión de PUM1 en diferentes tipos de cáncer. En los pacientes evaluados, las barras indican el porcentaje de muestras que tuvieron alta (azul oscuro), media (azul) o baja expresión (turquesa). Se observa alta expresión de PUM1 en muestras de cáncer de mama, cuello uterino, colon-recto, ovario, piel y urotelio. Tomado del atlas humano de proteínas (<http://www.proteinatlas.org/>).

La proteína PUM1 es caracterizada como un regulador de la transcripción y la Figura 9 muestra las proteínas que están mayormente asociadas a ésta. Aquí, se puede observar interacciones con proteínas conocidas plenamente en los estudios oncológicos como NANOG, reprogramador de células adultas; UBC, ubiquitina C y otras relacionadas al metabolismo celular.

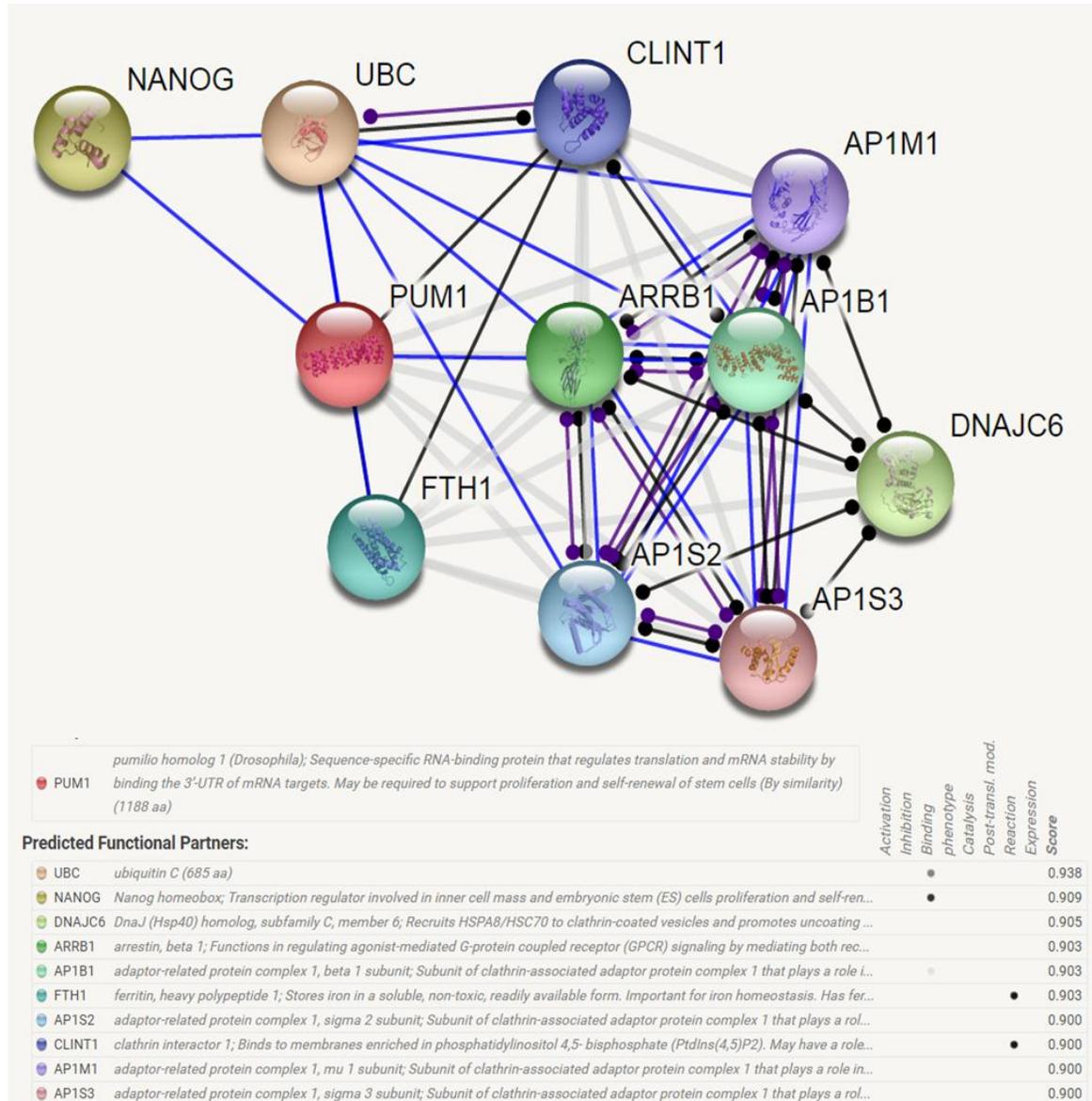


Figura 9. Red de asociación funcional de la proteína PUM1. Se muestran interacciones entre proteínas de tres tipos: unión (azul), reacción (negro) y catálisis (morado). Las líneas con pequeños círculos a los extremos indican que la dirección del efecto aún no ha sido determinada. De acuerdo a estas características, se otorga una calificación (score) que es una referencia de los vínculos más estables entre las proteínas mostradas. Tomado de la base de datos STRING DB (<http://string-db.org/>).

Se aclara que estas apreciaciones no han sido plenamente verificadas experimentalmente. Para este caso, la asociación con NANOG sólo fue mencionada en diversos reportes científicos (Durruty et al., 2014; Leeb et al., 2014), a diferencia de la conexión con la proteína Ubiquitina-C, la cual es verificada por co-expresión a través de pruebas bioquímicas.

2.8 Algoritmo de cuantificación

La cuantificación por dPCR está mediada por un cálculo estadístico realizado de forma posterior a la medición de fluorescencia en los pocillos del chip. El sistema QuantStudio 3D™ cuenta con un algoritmo que es aplicado a los resultados de fluorescencia y a través del cual se obtienen los valores de nivel de DNA en copias por microlitro. El cálculo inicia a partir del número de pocillos que fluorescen en el canal FAM (en color azul), VIC (en color rojo) o ambos (en color verde); aquellos pocillos que solo muestran contenido a través de un canal de control (ROX), son representados en color amarillo (Figura 10).

Este número de copias, o pocillos amplificados, es dividido entre el número de reacciones que se efectúan en el chip, aclarando que los 20 mil pocillos no son cubiertos en todos los casos, por ejemplo, en la imagen mostrada se cubren 15 050 pocillos, de los cuales sólo 14 565 cuentan con muestra (identificada por la fluorescencia en el canal ROX). Esto significa que 485 pocillos fueron cubiertos con muestra pero no emiten fluorescencia, esto puede deberse al alto riesgo de evaporación que circunda este proceso de cuantificación.

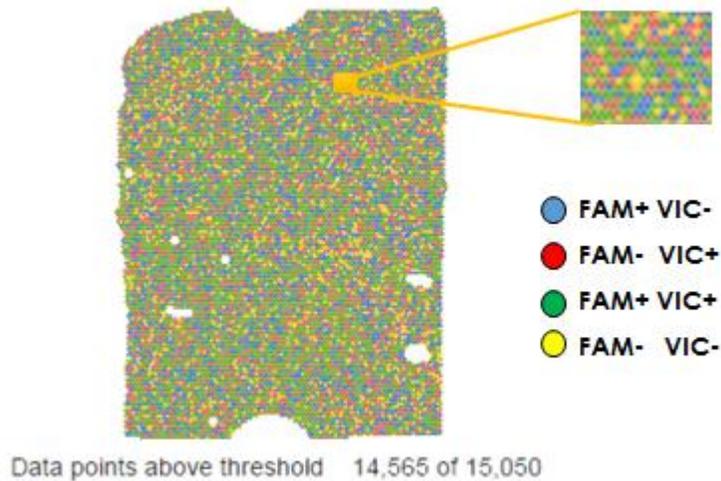


Figura 10. Fluorescencia captada en chip de cuantificación por dPCR. El sistema QuantStudio3D sobrepone la fluorescencia conseguida en los canales FAM (azul) y VIC (rojo); pocillos con ambas fluorescencias se muestran en color verde y si no se obtuvo amplificación, solo se reporta el canal de fondo (ROX, color amarillo).

En función a esto, se tiene un cociente de número de copias por reacción; es decir, el número de pocillos que emiten alguna fluorescencia de interés en relación al total de pocillos ocupados. Este valor es estandarizado mediante el producto con las 20 mil reacciones que deberían desarrollarse por muestra.

$$\frac{N^{\circ} \text{ copias}}{\text{Reacción}} \times N^{\circ} \text{ reacciones} = N^{\circ} \text{ copias por chip}$$

Luego, este valor es dividido por el número de microlitros inmerso en la muestra, el cual está calibrado en 15 μL (según instrucciones del fabricante). Entonces, se estima la cuantificación de una muestra de DNA a través de la siguiente ecuación:

$$\frac{N^{\circ} \text{ copias}}{\text{Reacción}} \times \frac{20000}{15} = \frac{N^{\circ} \text{ copias}}{\text{Reacción}} \times 1333.33 = \frac{N^{\circ} \text{ copias}}{\text{Volumen}}$$

El sistema digital reporta el valor de número de copias por reacción, así como el cálculo final en número de copias por microlitro. En ese caso, la interpretación mostrada puede ser empleada para estimar las concentraciones reales cuando se realicen variaciones en la preparación de muestras o chips. En la Tabla 3 se

muestra un ejemplo de los cálculos obtenidos de forma manual y la diferencia porcentual con el valor reportado por el equipo. Lo que puede ser usado para la interpretación adecuada de lecturas independientes.

Tabla 3. Estimación de la cuantificación por dPCR a través del cálculo manual. Los valores de copias por reacción provienen de una detección real del ensayo RNasa P en DNA genómico.

Chip	Copias por Reacción	Copias por chip	Copias por volumen		Dif. %
			Cálculo manual	Algoritmo QuantStudio 3D	
A	9.99E-03	2.00E+02	1.33E+01	13.235	0.6%
B	5.74E-03	1.15E+02	7.65E+00	7.603	0.7%
C	6.23E-03	1.25E+02	8.31E+00	8.257	0.6%
D	3.94E-03	7.88E+01	5.25E+00	5.224	0.6%
E	1.15E-02	2.30E+02	1.53E+01	15.18	1.0%
F	1.29E-02	2.58E+02	1.72E+01	17.137	0.4%
G	8.31E-03	1.66E+02	1.11E+01	11.009	0.6%
H	9.53E-03	1.91E+02	1.27E+01	12.619	0.7%
Prom. Incertidumbre					0.6%

Como se observa, la diferencia porcentual entre ambos métodos de estimación es del 0.6%, por lo que se podría confiar en el cálculo manual para la interpretación de resultados donde se modifiquen factores predeterminados por el fabricante, principalmente relacionados al volumen de muestra colocado en el chip.

III. HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis

Es posible evaluar el nivel de cfDNA en plasma de pacientes con cáncer de mama.

3.1.1 Hipótesis Estadísticas

Ha: Es posible evaluar el nivel de cfDNA en plasma de pacientes con cáncer de mama.

Ho: No es posible evaluar el nivel de cfDNA en plasma de pacientes con cáncer de mama.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar los niveles de cfDNA en plasma mediante PCR digital en pacientes con cáncer de mama.

4.2 Objetivos Específicos

- ✓ Estandarizar el método para obtener cfDNA en plasma.
- ✓ Evaluar los niveles de cfDNA en plasma por PCR digital a través de los genes PUM1 y RNasa P.
- ✓ Establecer los niveles de cfDNA en plasma en pacientes con cáncer de mama e individuos sanos.
- ✓ Relacionar los niveles de cfDNA en plasma con el estadio neoplásico.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Tipo de investigación

La presente investigación es de tipo básica, descriptiva, prospectiva, cuantitativa, transversal, observacional y de caso-control.

5.2 Población

- 16 mujeres con edades entre 28-80 años, diagnosticadas con cáncer de mama por el personal asistencial de la clínica Oncosalud, quien también aporta información clínica relacionada a edad, estadio de cáncer (de acuerdo al sistema TNM), histología (ductal, lobulillar o mixto), marcadores bioquímicos (ER/PR/HER2), concentración de linfocitos y glucosa en sangre.
- 21 mujeres sin diagnóstico positivo para cáncer de mama, mayores de 40 años, las cuales son codificadas como grupo control.

En ambos casos, las personas aceptaron su participación voluntaria en la investigación mediante la firma del Consentimiento Informado (Anexo 1) aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de San Martín de Porres (IRB00003251-FWA0015320).

5.3 Materiales

5.3.1 Reactivos

- Set de extracción con perlas magnéticas MagMAX Cell-Free DNA Isolation Kit (Applied Biosystems™)
- Ensayo de cuantificación Qubit® dsDNA HS (Invitrogen™)
- Master Mix QuantStudio™ 3D Digital PCR v.2.0 (Applied Biosystems™)
- Ensayos para evaluar el número de copias Taqman® PUM1 y RNAsa P (Applied Biosystems™)
- DNA Genómico CEPH 1347-02 (Applied Biosystems™)

- Tampón TBE (45 mM Tris-Borato/1 mM EDTA)
- Tampón TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA)
- Solución A (250 mM EDTA; 750 mM NaCl)
- Bromuro de Etidio 1 mg/L
- Cloroformo
- Cloruro de Sodio 6 M
- Fenol
- Sodio Duodecil Fosfato 100 g/L
- Proteinasa K 20 g/L
- Marcador de peso molecular KAPA™
- Agarosa
- Etanol Absoluto
- Agua ultrapura

5.3.2 Consumibles

- Tubos BD Vacutainer® K2 EDTA para toma de muestra
- Sujetador (*Holder*) Vacutainer® para toma de muestra
- Aguja de extracción de sangre 21G
- Puntas de micropipeta sin filtro de 10, 200 y 1000 microlitros.
- Puntas de micropipeta con filtro de 200 microlitros.
- Tubos de centrifuga de 0.2, 1.5 y 2.0 microlitros.
- Chips para dPCR QuantStudio™ 3D Digital PCR 20K v.2.0 (Applied Biosystems™)

5.3.3 Equipos

- Centrifuga refrigerada Eppendorf® 5804R
- Micropipetas Eppendorf® graduables hasta 10, 100 y 1000 microlitros.

- Ultracongeladora -80 °C (ThermoScientific™)
- Magneto DynaMag™-2 (Applied Biosystems™)
- Vórtex –Genie 2 (Scientific Industries, Inc.)
- Fluorómetro Qubit™ v.1.0 (Invitrogen™)
- Gel Doc XR System (Bio-Rad)
- Nanodrop Lite (Thermo Scientific)
- Rotor-Gene Q (Qiagen®)
- Sellador de chips QuantStudio™ 3D (Applied Biosystems™)
- Termociclador ProFlex™ con cabezal de chips y base inclinable.
- Instrumento de lectura de chips QuantStudio™ 3D (Applied Biosystems™)

5.4 Métodos

5.4.1 Toma de muestra

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de las participantes del estudio. En el caso de las pacientes, se consideraron dos tomas de muestra; la primera fue realizada un día antes del procedimiento quirúrgico y la segunda, una semana después de la intervención (pre y post operatorio). En todos los casos, la toma de muestra se realizó por venopunción empleando el sistema Vacutainer®.

5.4.2 Obtención de plasma

La sangre colectada fue centrifugada a 1200 g, 4 °C por 10 minutos, luego se separó el plasma en tubos de microcentrifuga, los cuales fueron centrifugados a 16000 g, 4 °C por 10 minutos para descartar cualquier contaminación con linfocitos; luego de este paso, se aisló el plasma

resultante en nuevos tubos de centrifuga, estos fueron almacenados a -80 °C hasta el momento de la extracción de cfDNA.

5.4.3 Estandarización de la extracción de cfDNA

Se eligieron 4 muestras de plasma de individuos diferentes a los participantes en el estudio. Estas muestras fueron extraídas con cuatro métodos diferentes, basados en la precipitación con fenol:cloroformo, la purificación con columnas o la extracción con perlas magnéticas.

El método basado en la precipitación con fenol-cloroformo se realizó según el protocolo descrito por Schmidt y colaboradores (2005). Se inició con 1 mL de plasma, al cual se le agregó 100 µL de solución A (250 mM EDTA; 750 mM NaCl), además 100 µL de Sodio Duodecil Sulfato (SDS 100 g/L) y 6µL de proteinasa K (20 g/L). La combinación fue incubada toda la noche a 50 °C. Luego, se adicionó 300 µL de NaCl 6M, se agitó en vórtex y fue centrifugado a 6000 g por 15 minutos. Se separó el sobrenadante y fue añadido con etanol absoluto en proporción 1:1, se incubó a -20 °C toda la noche y fue centrifugado a 16 440 g por 30 minutos. El precipitado fue resuspendido en 250 µL de agua ultrapura y se le agregó 250 µL de fenol:cloroformo (1:1); dicha adición formó un precipitado que fue separado del sobrenadante, al cual se le agregó 250 µL de cloroformo y el nuevo sobrenadante fue separado y adicionado con etanol frío (1:1). Se realizó un lavado con etanol 75%, se dejó secar y finalmente se resuspendió en 50 µL de tampón TE (10 mM Tris; 1 mM EDTA).

Los métodos basados en la purificación de columnas, fueron realizados de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes de los sets Pathogen Free DNA Isolation Kit (GeneProof®) y NucleoSpin® Plasma XS (Macherey Nagel).

Estas extracciones se realizaron con 1000 y 500 μL de plasma, siendo eluidas en 50 y 25 μL , respectivamente.

La extracción de cfDNA con el set de perlas magnéticas MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, con un volumen inicial de 800 μL de plasma. Posteriormente, se evaluó la cantidad de cfDNA (nanogramos) extraído en relación al volumen de muestra inicial y se compararon los métodos empleados.

5.4.4 Extracción de cfDNA

El cfDNA fue extraído a partir de plasma, con el set MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation. En tubos falcon de 15 mL, se preparó un mix con 12 μL de perlas magnéticas y 1 mL de tampón de unión, por cada muestra. Se distribuyó 1 mL de este mix con 0.8 mL de cada muestra de plasma.

Cada tubo fue agitado en vórtex por 10 minutos y colocados en el magneto donde se dejó reposar por 5 minutos. Una vez adheridas las perlas al magneto, se extrajo el residuo con ayuda de una micropipeta.

Posteriormente, los tubos fueron retirados del magneto, se les agregó 1 mL de tampón de lavado, se resuspendieron en nuevos tubos y fueron colocados nuevamente en el magneto. Se repitió 2 veces el lavado con etanol 80%, una vez extraído el último volumen de alcohol, se dejó secar con la tapa abierta por 6 minutos.

Finalmente, se agregó 40 μL de tampón de elución, agitando en vórtex por 5 minutos y se colocó en el magneto por 2 minutos para extraer el volumen con el DNA suspendido. Un resumen gráfico de este procedimiento, se muestra en la Figura 11.

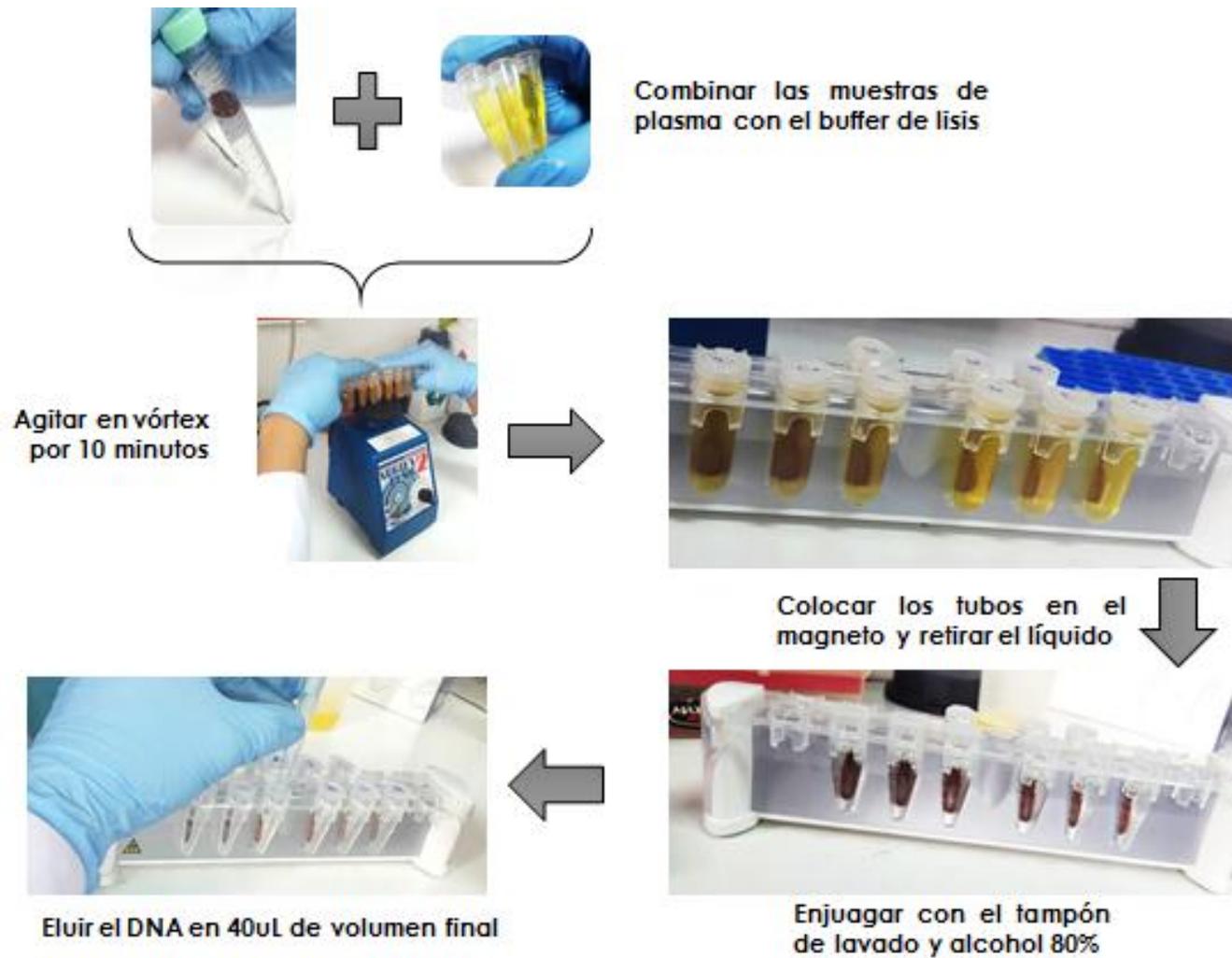


Figura 11. Esquema de trabajo para la extracción de cfDNA con perlas magnéticas. Representación del protocolo diseñado para el set MagMax Cell Free DNA Isolation™

5.4.5 Estandarización del método de cuantificación

Se compararon 4 técnicas de cuantificación a través de la medición de alícuotas de DNA genómico (CEPH 1347-02, Applied Biosystems™) a distintas concentraciones. Se prepararon alícuotas a concentraciones teóricas de 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25 y 0.1 ng/μL; dichas alícuotas se hicieron por duplicado a partir de una concentración de 50 ng/μL.

Cada alícuota fue medida por espectrofotometría (Nanodrop Lite, Thermo Scientific), fluorometría (Qubit™, Invitrogen), qPCR (Rotor-Gene Q, Qiagen®) y dPCR (QuantStudio3D™, Applied Biosystems). Todas las mediciones se hicieron por duplicado y la metodología depende de las indicaciones de cada fabricante.

Para la medición con espectrofotometría, se colocó 1 μL de muestra en el equipo Nandrop Lite, el cual fue calibrado previamente con 1 μL de agua ultrapura y reportó la medición en nanogramos por microlitro. La cuantificación por fluorometría se realizó combinando 1 μL de cada alícuota con 199 μL del mix fluoróforo:tampón (1:199) y la combinación se colocó en el equipo Qubit que reportó valores en nanogramos por microlitro. Para la cuantificación basada en PCR, se preparó un mix con SYBR Master Mix 2x, primers ubicados en el exón 7 de BRCA1 (10x) y 3 μL de DNA en un volumen total de 12.5 μL, dicho mix fue colocado en los tubos de amplificación de qPCR (Rotor-gene Q) y en chips de dPCR (QuantStudio3D). Los programas de amplificación y las lecturas se realizaron de acuerdo a las indicaciones de cada fabricante. La qPCR fue calibrada previamente con muestras a distintas concentraciones (curva estándar) y esto permitió reportar la cuantificación en nanogramos por microlitro; mientras, la dPCR reportó sus valores en copias por microlitro y este valor fue transformado a

través de la relación entre copias genómicas y peso de DNA (300 copias=1 nanogramo de DNA, UGSC 2017). Finalmente, se compararon las medidas conseguidas en relación a las concentraciones teóricas en cada caso.

5.4.6 Cuantificación de cfDNA total

Para cuantificar el cfDNA total, se empleó el set de fluorometría Qubit dsDNA HS Assay Kit, colocando 1 μ L de muestra con 199 μ L de reactivo (1:199 Fluoróforo:Tampón). Las lecturas se realizaron en el fluorómetro Qubit™ v. 1.0 (Invitrogen) y las medidas se expresaron en nanogramos por microlitro.

5.4.7 Integridad de cfDNA

La evaluación de integridad se realizó por electroforesis, para ello, se prepararon geles de agarosa 1% en tampón TBE y se cargó 2 μ L de cada cfDNA extraído. Todas las muestras fueron corridas a 100 voltios, conservando amperaje constante, por 35 minutos. En cada corrida se incluyó un marcador de peso molecular (KAPA™ Universal DNA Ladder).

Luego de la corrida electroforética, cada gel fue colocado en una solución de Bromuro de Etidio 1 mg/L por 15 minutos y fue revelado en el fotodocumentador Gel Doc XR System (Bio-Rad).

5.4.8 Cuantificación por PCR digital

La evaluación de niveles de cfDNA en pacientes con cáncer de mama y controles se realizó con ensayos de detección en los genes PUM1 (Ensembl:ENSG134644) y RNasa P (RPPH1; Ensembl:ENSG148688) y, los valores incluidos en la preparación del mix fueron calculados en un volumen final de 15 μ L, con un 30% de contenido de DNA.

Las combinaciones de reactivos fueron realizadas en tubos de microcentrifuga de 0.2 mL, a partir de los cuales, se cargaron los chips con ayuda de un dispensador, luego se agregó aceite mineral y fueron sellados para evitar la evaporación.

Los chips sellados fueron colocados en un termociclador ProFlex™ (Applied Biosystems) con el programa indicado por el fabricante. Dicho programa involucra una denaturación inicial a 96 °C por 10 minutos, seguida de 44 ciclos de hibridación-extensión a 60 °C por 2 minutos con denaturación a 98 °C por 30 segundos y una extensión final a 60 °C por 2 minutos. Luego, los chips son conservados a 10 °C hasta el momento de su lectura. Este paso se realiza en el sistema QuantStudio3D™ y los resultados son analizados en el servidor web brindado por el fabricante (Figura 12).

5.4.9 Análisis Estadístico

Los gráficos y valores fueron analizados en el servidor QuantStudio3D Analysis Suite v.3.0.3, luego se evaluó la distribución de los valores y se realizó la prueba de Mann-Whitney para muestras independientes, así como el test de Wilcoxon para muestras apareadas entre los marcadores empleados, igualmente, las diferencias en especificidad y sensibilidad a través de la curva ROC. Además, se evaluó la correlación entre los valores reportados por la cuantificación total y la cuantificación absoluta. Para estos fines se usaron los programas InfoStat 2015 y MS Office Excel 2013.

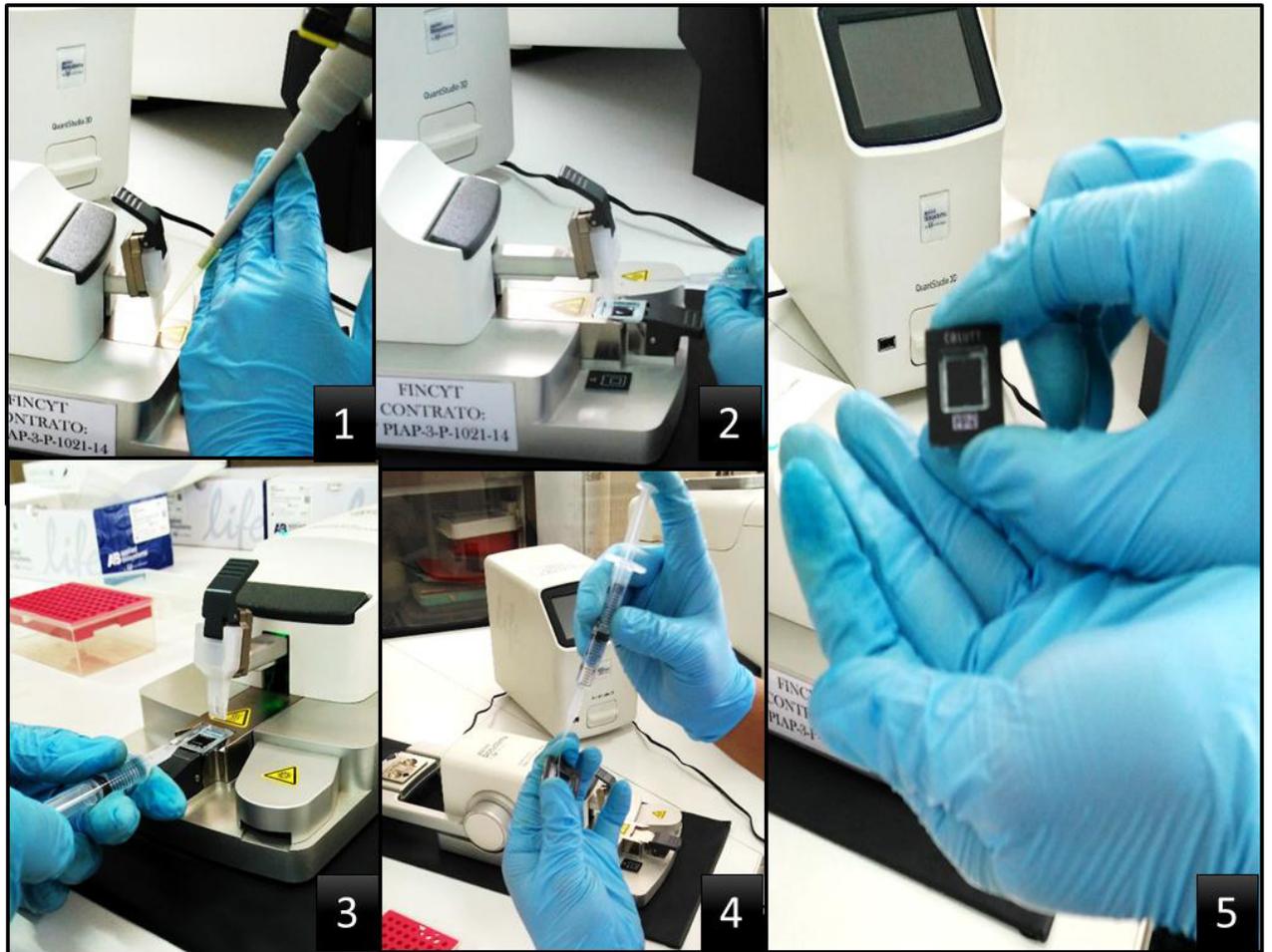


Figura 12. Preparación de chips con muestra para cuantificación por dPCR. (1) Inserción de 15 μL de mix en dispensador. (2) Distribución de muestra en los micropocillos del chip. (3) Adición de aceite para evitar evaporación. (4) Sellado del chip. (5) Presentación lista para colocar en termociclador.

VI. RESULTADOS

5.1 Extracción de cfDNA

En la evaluación de los métodos de extracción verificados, se encuentra una mayor cantidad de cfDNA siguiendo el protocolo de extracción con perlas magnéticas. Los valores promedio de las 4 muestras evaluadas se encontraron entre 2.68 ng/ μ L (Extracción con fenol:cloroformo) y 12.85 ng/ μ L (Extracción con set MagMax Cell free DNA Isolation); sin embargo, los volúmenes iniciales de plasma y recolección de DNA fueron diferentes entre los métodos empleados, por esta razón se calculó la cantidad de cfDNA extraído (nanogramos) en relación al volumen inicial de plasma (microlitros), a fin de normalizar los resultados obtenidos y poder compararlos.

En la Figura 13, se observa que el método de extracción convencional por reacción química (fenol-cloroformo) obtiene una baja concentración de cfDNA, en comparación a los métodos mediados por sets comerciales. Respecto a éstos, aquellos basados en purificación por columnas mostraron una cantidad heterogénea en función al set empleado (GeneProof o NucleoSpin). Finalmente, el método de extracción con perlas magnéticas obtuvo la mayor concentración de cfDNA a partir de un menor volumen menor que el empleado por el método convencional.

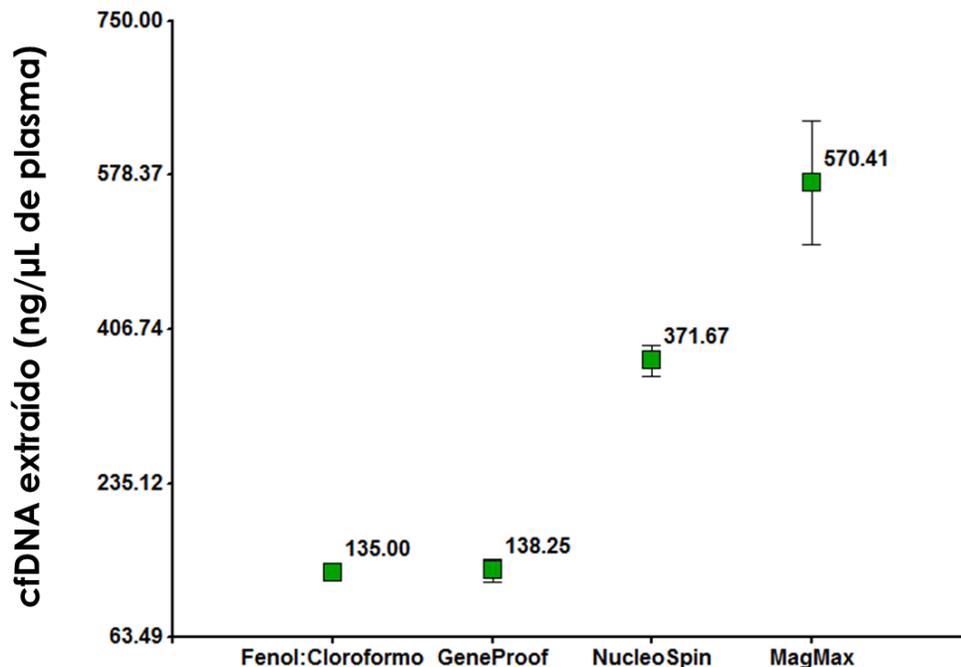


Figura 13. Concentración de cfDNA según método de extracción. Las cajas verdes muestran los valores promedio para cada método de extracción y las barras señalan la desviación estándar encontrada entre las muestras cuantificadas. Los resultados fueron obtenidos por cuantificación con Qubit™.

A pesar de las diferencias observadas en los distintos métodos de extracción, se comprende que las concentraciones obtenidas en cfDNA de plasma son muy bajas en comparación al DNA total de una muestra de sangre, el cual proviene principalmente de la carga linfocitaria del individuo.

En la Figura 14, se muestra una comparación entre las concentraciones de DNA a partir del tipo de muestra (sangre o plasma), los valores representados corresponden a la cantidad de DNA (nanogramos) que es extraído por cada mililitro de volumen inicial. Los datos de DNA extraído de sangre fueron proporcionados por el Centro de Investigación en Genética y Biología Molecular (FMH-USMP), las muestras corresponden a todas las muestras atendidas en el centro (controles y

pacientes) en el periodo de realización de la tesis y que fueron extraídas con un método convencional basado en la remoción de sales.

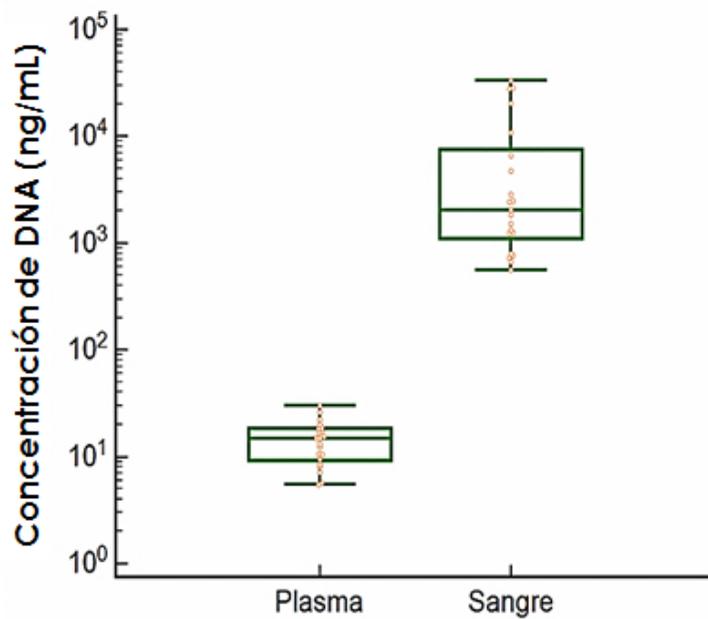


Figura 14. Concentración de DNA obtenido en plasma y sangre total. Los valores fueron reportados con Qubit y expresados en nanogramos por mililitro de muestra. La concentración de DNA linfocitario representa más de 1000 veces la carga de cfDNA en plasma.

5.2 Integridad de cfDNA

Debido a la baja concentración del cfDNA extraído, no se pudo verificar la integridad de dichos ácidos nucleicos a través de la observación de geles de agarosa (Figura 15). Nótese que de acuerdo a lo mostrado en la Figura 14, las extracciones de DNA linfocitario resultan en una mayor cantidad de DNA por lo que sería fácilmente notable en una corrida electroforética, mientras que las muestras de cfDNA no evidencian aparición de ninguna banda.

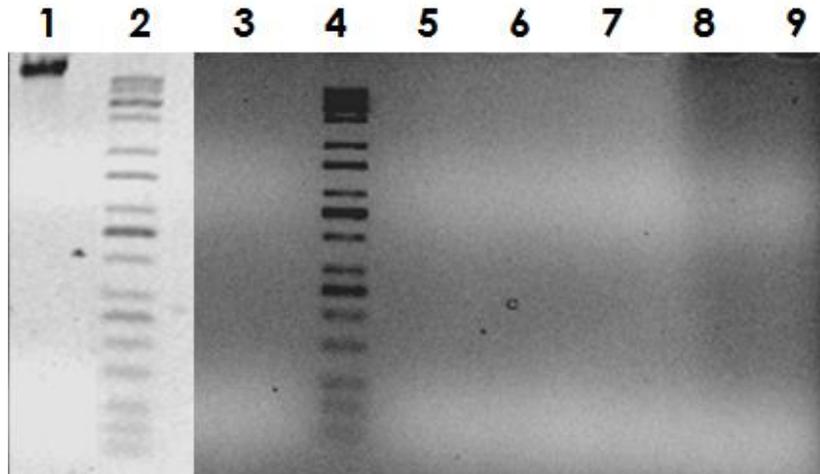


Figura 15. Corrida electroforética de cfDNA. Las muestras de cfDNA extraído con perlas magnéticas no evidencian banda en un gel de agarosa 1%. El pocillo 1 muestra un control positivo de DNA linfocitario (50 ng/ μ L), los pocillos 2 y 4 muestran el marcador de peso molecular Kapa y los pocillos 3, 5-9 fueron cargados con muestras de cfDNA.

5.3 Cuantificación de cfDNA

Los resultados de cuantificación muestran los límites de detección y la eficiencia de las técnicas empleadas. En ese sentido, se calculó la cobertura porcentual de las mediciones reportadas en función a la concentración teórica de cada muestra. Así, la cuantificación por fluorometría (Qubit) fue la primera en mostrar dificultades en la detección de cfDNA a una concentración menor a 5 ng/ μ L, en esos casos el equipo reportó un valor por debajo del límite de la curva patrón. La cuantificación por espectrofotometría (Nanodrop Lite) mostró una detección de cfDNA en muestras con concentración mayor a 0.5 ng/ μ L, a diferencia de las cuantificaciones basadas en PCR que mostraron resultados en todas las alícuotas (Tabla 4).

Tabla 4. Resultado de cuantificación según plataforma. Se muestran los valores de concentración teórica de cada alícuota y el valor promedio de la medición obtenida en relación a la técnica empleada. Todos los valores están expresados en nanogramos por microlitro.

Concentración Teórica	10	5	2.5	1	0.5	0.25	0.1
Nanodrop	8.6	5.4	3	1.2	0.3	ND	ND
Qubit	7.26	3.55	ND	ND	ND	ND	ND
qPCR	11.72	6.20	3.25	0.96	0.38	0.10	0.00
dPCR	10.2	4.92	2.46	0.95	0.53	0.38	0.20

ND= No disponible

Como se observa, algunos de los valores se encuentran por encima o por debajo de las concentraciones teóricas de cada alícuota, por ello, se calculó el valor absoluto de cobertura; es decir, que tan aproximadas al valor teórico se encuentran estas mediciones. En ese sentido, la dPCR muestra los valores más cercanos a los teóricos, con una eficiencia mayor al 90%, hasta la alícuota de 0.5 ng/ μ L; mientras, la qPCR mantiene una eficiencia promedio de 75% hasta la misma alícuota. Respecto a las mediciones por espectrofotometría y fluorometría, se muestran una mayor estabilidad en la cuantificación con Qubit; sin embargo, ésta solo cubre muestras hasta la alícuota de 5 ng/ μ L, mientras que la medición con Nanodrop permite cuantificar un mayor espectro de muestras con eficiencia variable (60-92%); los datos mencionados se grafican en la Figura 16.

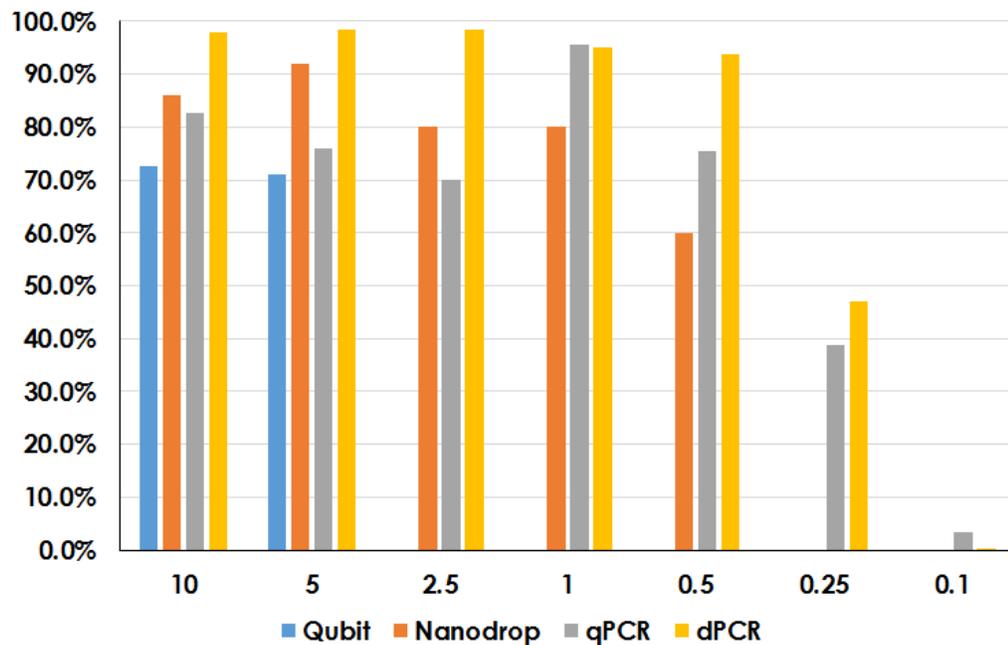


Figura 16. Eficiencia en la cuantificación de cfDNA. El eje horizontal muestra las concentraciones de las alícuotas preparadas (ng/μL) para la cuantificación con las 4 plataformas descritas (Qubit, Nanodrop, qPCR y dPCR). Las barras muestran la eficiencia conseguida entre el valor promedio de mediciones y el dato teórico.

5.4 Cuantificación por fluorimetría

Se extrajeron 53 muestras de cfDNA entre controles (21) y pacientes (32), sin embargo, sólo se consiguió cuantificar DNA en 40 casos (16 pacientes pre-operatorio, 12 pacientes post-operatorio y 12 controles), considerando que se empleó un set de detección de alta sensibilidad, encontramos que en muchos casos, la concentración de cfDNA no puede ser precisada con este método (Figura 17).

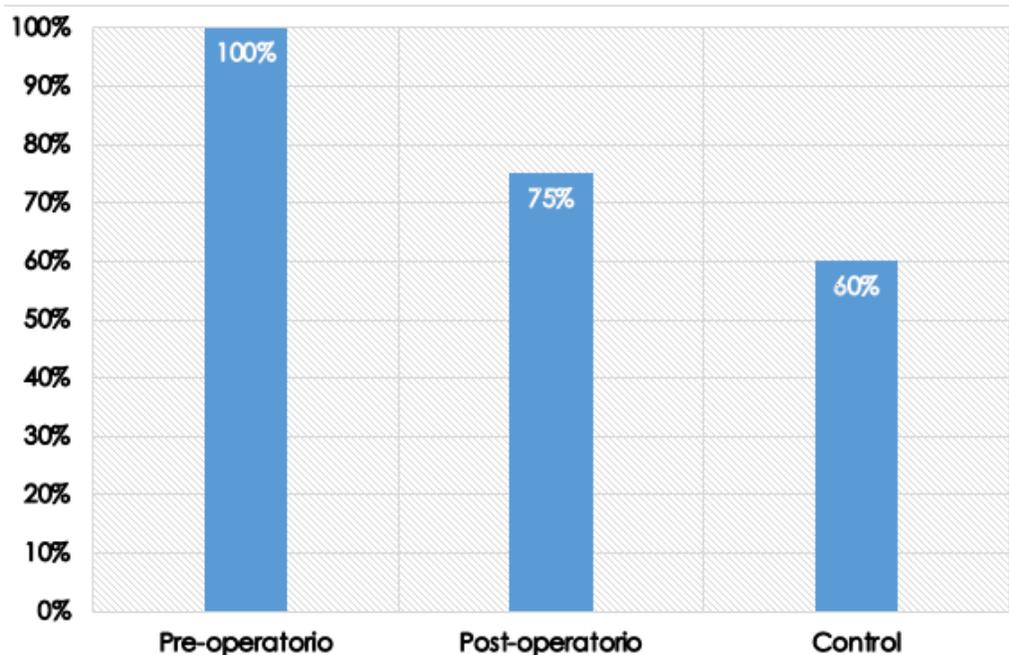


Figura 17. Porcentaje de resultados cuantificados por fluorometría. En 13 muestras no se logró una medición en Qubit (se reportó valor por debajo del límite mínimo), dichas muestras están repartidas entre controles (9) y la toma post operatoria de pacientes (4). Se muestra la proporción de cobertura en cada caso, todas las muestras fueron cuantificadas con dPCR.

Con los datos analizables, que constituyen 28 de 37 valores posibles (entre controles y pacientes pre-operatorio), la cuantificación de cfDNA muestra diferencias significativas ($p=0.0001$, Figura 18). Asimismo, las diferencias entre estos grupos son utilizadas para establecer el punto de corte en 13.4 ng/mL de plasma, lo que significa que valores mayores a este valor pueden ser considerados como potencial desarrollo neoplásico, con 100% de especificidad y 80% de sensibilidad.

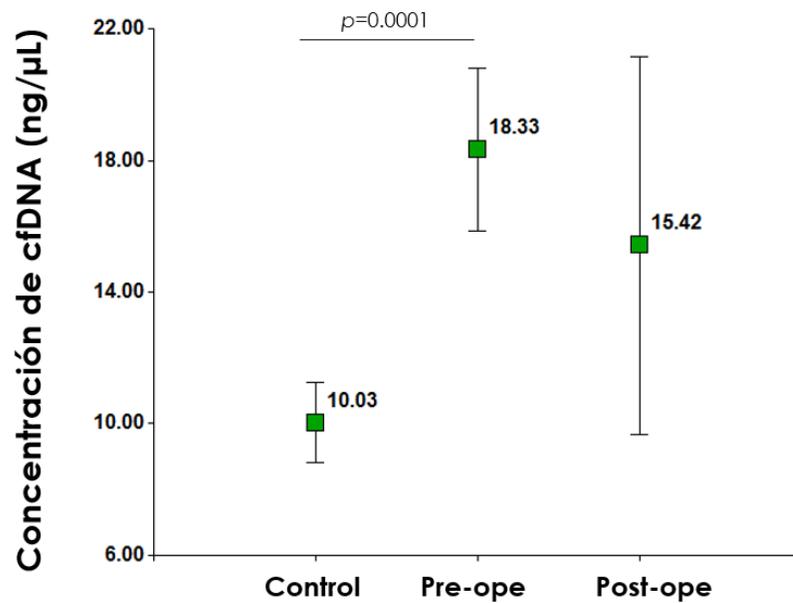


Figura 18. Cuantificación de cfDNA con Qubit™ entre controles y pacientes. Las muestras de pacientes se encuentran distribuidas en las tomas realizadas (pre y post operatorio). Las cajas verdes muestran el valor promedio en cada caso y las proyecciones en negro señalan el intervalo de confianza. Se encuentran diferencias significativas entre los grupos Control y Pre-operatorio en pacientes ($p=0.0001$).

5.5 Cuantificación por dPCR

Se obtuvieron datos de medición para las 53 muestras (21 controles, 16 pacientes pre-operación y 16 pacientes post-operación), cada una reporta una cuantificación independiente en PUM1 y RNasa P. En todos los casos, los valores de cuantificación son expresados en copias por microlitro y éstos no presentaron distribución normal ($p<0.01$). En una evaluación independiente, el grupo control presentó menor probabilidad de tener distribución normal ($p=0.02$ para cada ensayo evaluado), en comparación a los valores de los grupos pre-operatorio ($p=0.61$ y 0.18 para PUM1 y RNasa P, respectivamente) y post-operatorio ($p=0.13$ y 0.22 para PUM1 y RNasa P, respectivamente). Por lo general, la distribución normal explica que la materia de evaluación está siendo afectada principalmente por pocos factores, que en el caso de pacientes puede deberse al desarrollo neoplásico o al proceso quirúrgico; mientras que en los controles, puede originarse

por los múltiples factores asociados al ritmo de vida y desempeño de actividades diarias. Además de las referencias estadísticas, se consideran los gráficos de cada caso para seleccionar herramientas no paramétricas en los siguientes análisis (Figura 19).

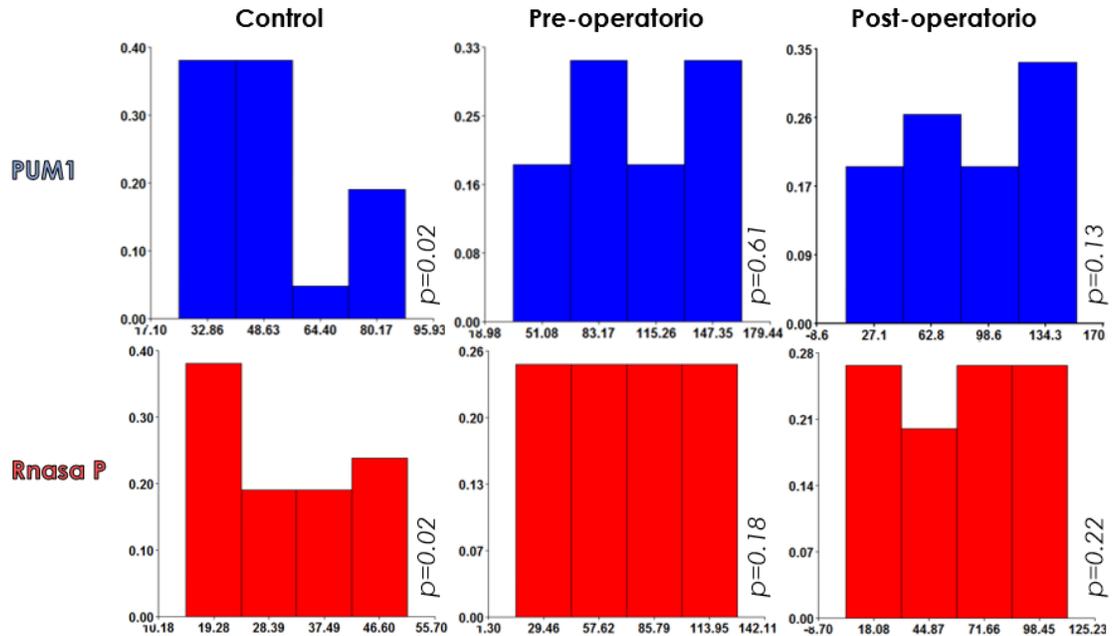


Figura 19. Histogramas de valores de cuantificación de cfDNA. Se muestra la distribución de resultados de medición por dPCR empleando los ensayos PUM1 (azul, fila superior) y RNasa P (rojo, fila inferior). Se clasifican los gráficos según el grupo de individuos (control, paciente pre-operatorio y paciente post-operatorio). En cada caso, el eje de las abscisas representa el valor promedio de cuantificación en copias por microlitro y el eje de las ordenadas, la frecuencia relativa para dichas mediciones.

En la comparación de valores de cuantificación, se encuentran diferencias significativas entre los grupos control y paciente pre-operatorio en ambos ensayos ($p=0.0001$, PUM1; $p=0.0003$, RNasa P; Figura 20); en tanto, otros grupos de comparación (control/post-operatorio o pre/post-operatorio) no muestran diferencias significativas en la evaluación estadística.

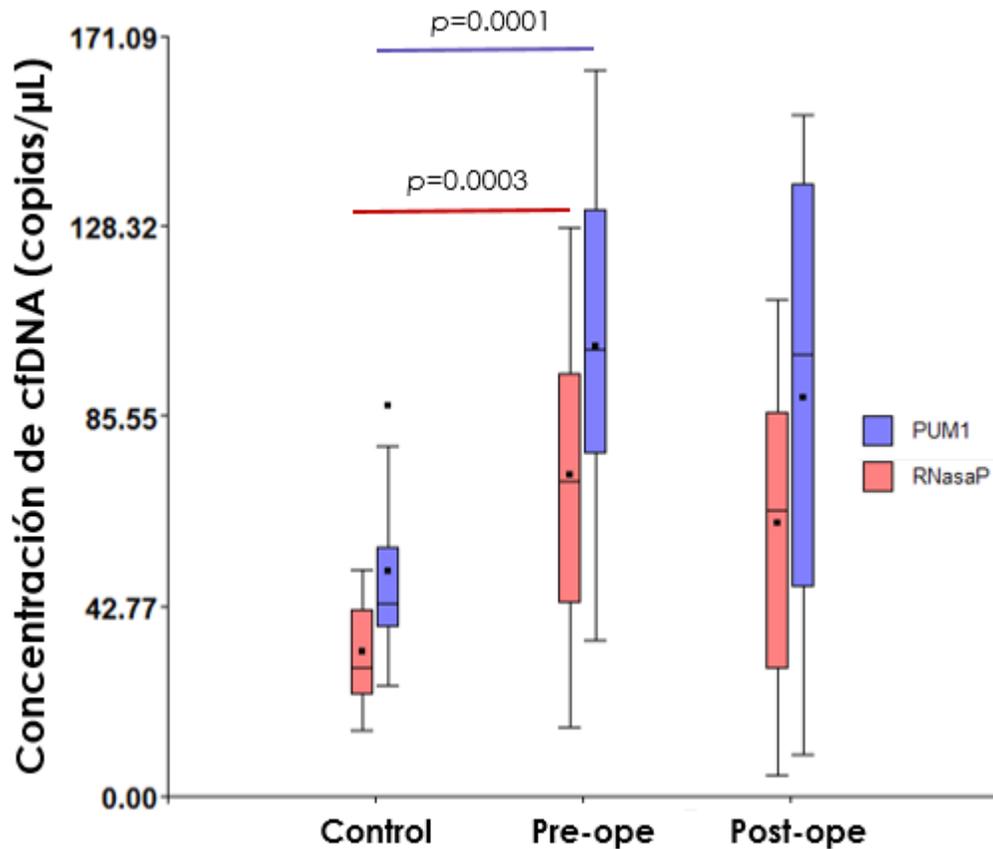


Figura 20. Cuantificación de cfDNA por dPCR. Se muestran los valores de concentración expresados en copias por microlitro y clasificados según ensayo (PUM1 o RNasa P). Se encuentran diferencias significativas entre el grupo control y paciente pre-operatorio ($\alpha=99\%$).

Como se observa en la Figura 20, existen diferencias más notorias en relación al grupo control que entre los grupos de pacientes. Además, la detección con ensayos distintos a RNasa P resulta en diferencias más marcadas entre los grupos analizados (pacientes y controles); sin embargo, no se encuentran diferencias significativas entre los estadios pre y postoperatorio, con valores de p iguales a 0.0118 (PUM1) y 0.0184 (RNasa P).

De esta forma, se establecen los puntos de corte que permiten diferenciar a una muestra indeterminada entre un control o paciente, estos valores son estimados en

78.995 copias/ μL (13.17 ng/mL de plasma) para PUM1 y 51.154 copias/ μL (8.53 ng/mL de plasma) para RNAsa P. Esta información es acreditada con valores de sensibilidad y especificidad que favorecen a PUM1 (75% y 95.2%, respectivamente), en comparación a los estimados para RNAsa P (62.5% y 100%), como se observa en la Figura 21.

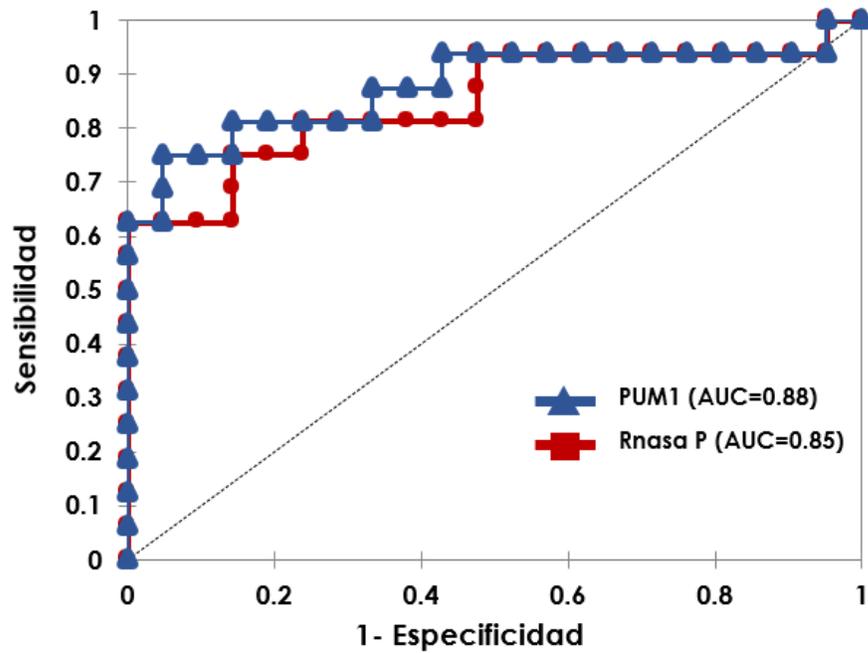


Figura 21. Curva ROC de los ensayos empleados en la dPCR. Se muestran las curvas para PUM1 (azul) y RNasa P (rojo), los valores de área bajo la curva (AUC) son mostrados entre paréntesis en cada caso.

5.6 Comparación entre estadios oncológicos

De total de pacientes, 10 presentaron estadio I, 3 con estadio II y 3 con estadio III. Todas las muestras de pacientes mostraron niveles de cfDNA más altos en relación a los controles (Figura 20), sin embargo, en la clasificación por estadios, se observa que los pacientes con estadio I muestran concentraciones de cfDNA más altas que otros estadios avanzados (II y III), a pesar de que estos últimos estadios tienen una cantidad muy baja de participantes. Así, se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y las pacientes con estadio I ($p < 0.01$, Figura 22).

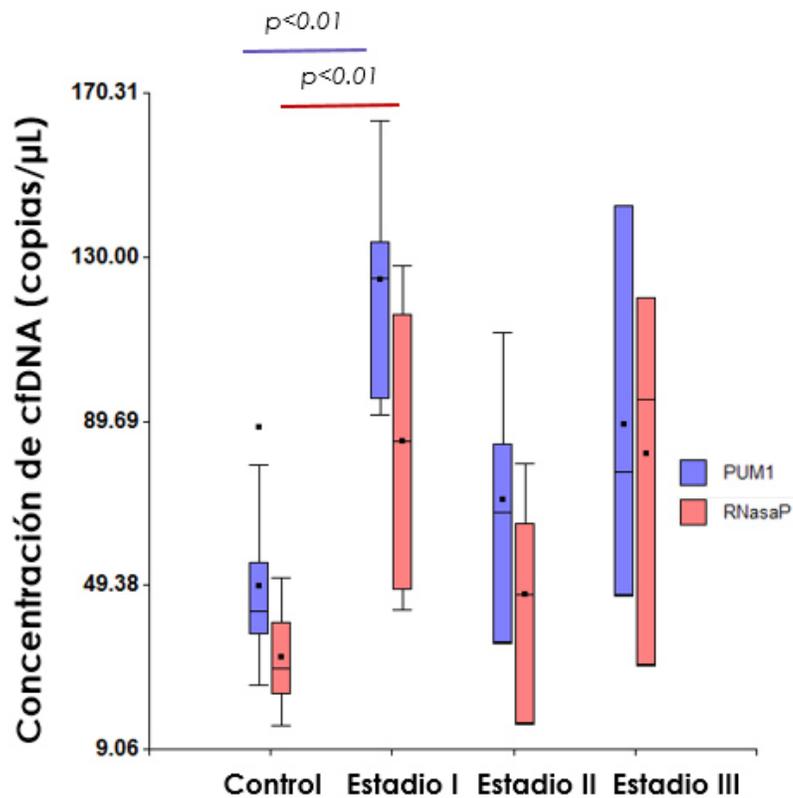


Figura 22. Número de copias de cfDNA entre grupo control y estadios neoplásicos. Se muestran datos de cuantificación por dPCR según ensayos PUM1 (azul) y RNasa P (rojo). La concentración de cfDNA es expresada en copias por microlitro y se incluye el valor p en los casos donde existe diferencia significativa.

5.7 Correlación entre cuantificaciones de cfDNA

El cfDNA en plasma puede ser cuantificado de forma total, empleando técnicas como fluorometría, o de forma absoluta y específica, a través de la detección de regiones por dPCR. En las muestras cuantificadas con Qubit y dPCR no existe correlación, existiendo diferencias significativas ($p=0.0009$ con ensayo PUM1; $p=0.0005$ con ensayo RNasa P), que remarcan los valores obtenidos en ambos ensayos (Figura 23). De acuerdo a la gráfica, si la distribución de fragmentos genómicos fuera homogénea, se podría comparar ambas cuantificaciones y tener valores que asemejen una línea recta. Sin embargo, los puntos del gráfico no se distribuyen de forma directamente proporcional por lo que se infiere que la presencia de cfDNA fragmentado es heterogénea, lo cual favorece el empleo de técnicas que cuantifiquen estos ácidos nucleicos a partir de regiones específicas.

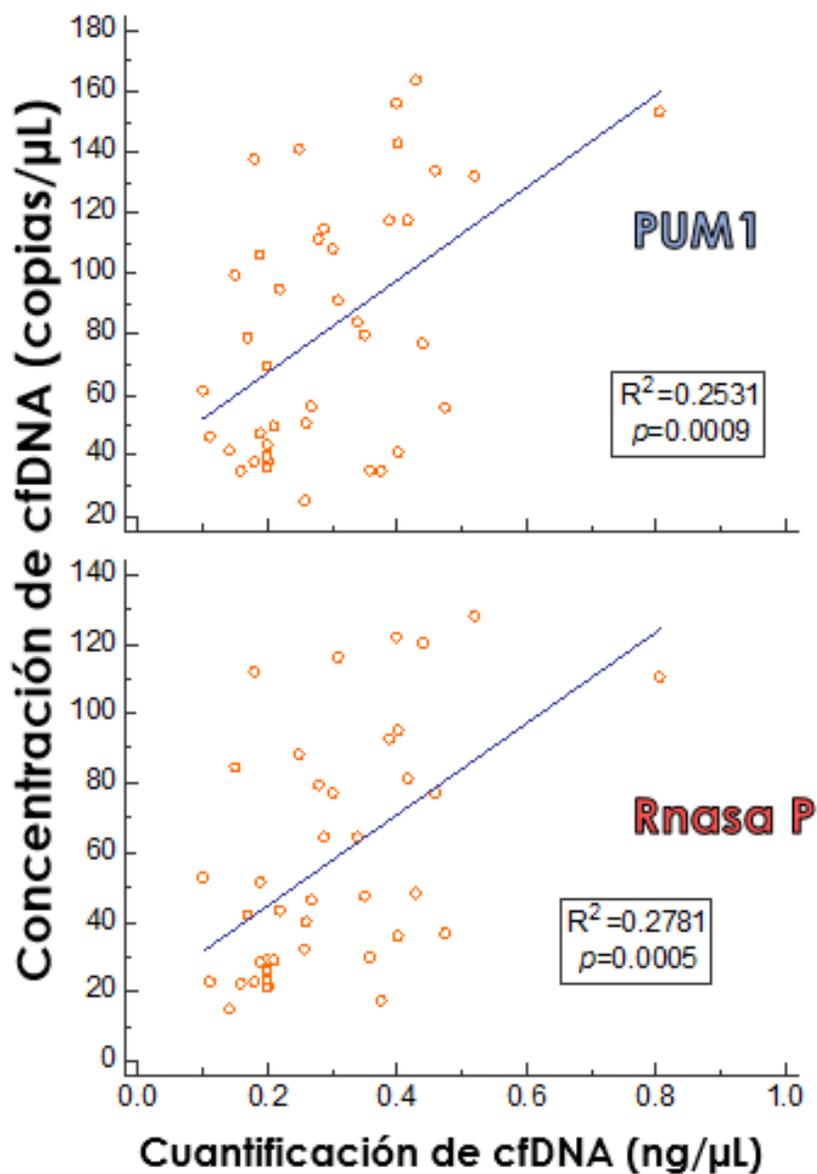


Figura 23. Correlación entre cuantificación Qubit y dPCR. Se muestran resultados de cuantificación específica (medido por dPCR y reportado en copias por microlitro) y cuantificación total (realizado por Qubit, expresado en nanogramos por microlitro). No se observa correlación entre los valores analizados según ensayo (PUM1 y RNasa P).

VII. DISCUSIÓN

6.1 cfDNA como biomarcador

Los linfocitos constituyen la fuente de ácidos nucleicos más empleada en la evaluación de contenido genético asociado a múltiples enfermedades, la extracción de DNA puede realizarse directamente de la capa linfocitaria o a partir de sangre total; otra fuente importante para la obtención de ácidos nucleicos son las células de la mucosa bucal (Steinberg et al., 2002). Sin embargo, el recurso usado para extraer DNA puede variar en función al comportamiento clínico-molecular de la enfermedad, un ejemplo de esto es apreciable en el análisis de infecciones microbianas o virales, donde se encuentran ácidos nucleicos foráneos en sangre, así como en otros fluidos: HBV en saliva (Vandereijk et al., 2004); *Plasmodium falciparum* en orina, *Wuchereria bancrofti* en esputo, *Schistosoma haematobium* en semen, entre otros (Weerakoon y McManus 2016).

Por estas razones, los cfDNAs han cobrado importancia en los últimos años, debido principalmente a la naturaleza de su origen. Este tipo de ácidos nucleicos puede ser exógeno, mediado por agentes infecciosos; o endógeno, por la liberación natural de vesículas con ácidos nucleicos o por la lisis de grupos celulares con alta concentración, como los producidos por enfermedades autoinmunes (Zhang et al., 2014) o cáncer (Schwarzenbach et al., 2011).

Un aspecto interesante de los cfDNAs es la posibilidad de evaluar distintas enfermedades con una muestra de sangre total, a partir de la cual se separa el plasma, esto significa el aprovechamiento del flujo sanguíneo como recurso sistémico, representado como un método de diagnóstico molecular no invasivo. Además, diversos autores coinciden en que la concentración de cfDNA es muy

baja en una persona sin aparente desarrollo de enfermedad, han precisado este valor entre 10-100 ng/mL de plasma y también han señalado que puede variar ligeramente con diversas condiciones biológicas como el ciclo menstrual, presencia de diabetes o activación del sistema inmune (Poelcher et al., 2010; Spindler et al., 2014; Nishimoto et al., 2016). Como resultado de los estudios mencionados, se reconocen a los cfNAs en fluidos como un biomarcador oportuno en el estudio de diversas enfermedades, los cuales precisan una óptima técnica de extracción y purificación, así como un método de detección-cuantificación más sensible y específico.

En el caso específico del control y diagnóstico de cáncer, el cfDNA se ofrece como el recurso más apropiado para conocer el estadio biológico en forma periódica y sin comprometer algún riesgo en el paciente, a diferencia de las biopsias sólidas. Esto introduce el concepto de biopsia líquida, asociada al criterio de determinar la cantidad de DNA presente en fluidos como el plasma, su grado de metilación, su expresión o las mutaciones que pueda contener (con origen en células tumorales) a fin de determinar la condición oncológica del paciente.

6.2 Sistemas de extracción de cfDNA

En la presente tesis se probaron 4 métodos de extracción de cfDNA, encontrando ventajas y desventajas entre estas opciones. Así, con los resultados de la Figura 13 se determina que la extracción con perlas magnéticas ofrece los mejores resultados en aprovechamiento, calidad y concentración de la muestra. Sin embargo, este proceso puede resultar engorroso considerando la complejidad del proceso y el alto riesgo de contaminación, a diferencia de la purificación por columnas que es realizada en un ambiente más cerrado, donde el procedimiento

es limitado a colocar reactivos en columnas y centrifugarlas sin alterar la matriz de silica que contienen.

En búsqueda de la mayor captación de ácidos nucleicos se elige la extracción con perlas magnéticas, sin embargo, se precisa un aumento de este tipo de trabajos a fin de tener datos con los cuales se contrasten los resultados obtenidos. Esto se debe a que existe gran controversia por el nivel promedio de cfDNA en controles y estos valores dependen de los métodos empleados para extracción y cuantificación (Tabla 2).

Considerando la variabilidad existente entre los tipos de extracción realizados, todos coinciden en que la mayor dificultad del trabajo con cfDNA se encuentra en la baja concentración que esta posee, claramente corresponde a lo descrito en la literatura acerca de la procedencia, origen y tiempo de vida del cfDNA (Hayat 2013; Schwarzenbach et al., 2011) y es verificado cuando comparamos la capacidad de extracción de cfDNA con métodos muy elaborados en relación a la concentración de DNA linfocitario obtenida con un método convencional (Figura 14).

6.3 Sistemas de detección de cfDNA

Bajo el conocimiento que el plasma presenta una concentración muy baja de cfDNA se ha optado por el uso de la dPCR para su cuantificación. Sin embargo, encontramos que otras plataformas, como fluorimetría, espectrofotometría o qPCR, podrían medir estos ácidos nucleicos en dependencia de la concentración esperada. Así, en la Figura 18, se describen las diferencias de estas técnicas en la eficiencia o cobertura del valor teórico. Evidentemente, estos resultados se contrastan con aquellos obtenidos en la Figura 20 donde se observa que la

medición con Qubit no muestra resultados en todas las muestras, existiendo un margen muestral que no podría ser cuantificado con esta técnica. Sin embargo, la cuantificación por fluorometría muestra estabilidad en la cobertura del valor teórico, a diferencia de la cuantificación por Nanodrop, donde la eficiencia de la prueba depende básicamente de la concentración.

Los valores referenciales empleados en la cuantificación muestran un nivel máximo de 26 ng/mL de plasma en la muestra de un paciente y un valor diferencial de 13.4 ng/mL de plasma entre pacientes y controles (Figura 20). En cuanto al diseño empleado, se realizó la evaluación del número de copias de dos regiones determinadas como referenciales por la literatura, con el propósito de establecer sus niveles y aportando a lo mencionado en el trabajo de Hyun y colaboradores (2016) en el sentido de que los distintos tipos de cáncer puedan favorecer la presencia de fragmentos específicos en el cfDNA.

El diseño experimental de la tesis, se distingue de la mayoría de trabajos enfocados en cáncer de mama y encontrados en la literatura; aquellos evalúan la diferencia entre pacientes y controles a través de la expresión de genes muy implicados en el desarrollo oncológico por medio de cDNA (Heredia et al., 2013), la presencia de alelos mutados (Dawson et al., 2013), la amplificación de HER2 (Forsheew et al., 2012; Belgrader et al., 2013; Gevensleben et al., 2013), la presencia de mutaciones de *PIK3CA* en pacientes con estadios tempranos (Beaver et al., 2014) y la cuantificación de miRNAs (Jiang et al., 2013). Todos los trabajos mencionados ofrecen resultados que determinan diferencias entre pacientes con cáncer de mama y controles, desde distintos enfoques y un grupo muy reducido lo hace considerando enfáticamente los estadios iniciales, con un

propósito claro de usar estos resultados a futuro en el diseño de estrategias de detección temprana en un método no invasivo, al igual que la presente tesis.

6.4 Integridad de cfDNA

En la Figura 15 se muestra que la integridad del cfDNA no puede ser evaluada por corrida electroforética debido a su baja concentración; sin embargo, con los resultados de la Figura 23 se puede interpretar una fragmentación del cfDNA debido a que la cuantificación total de las muestras no corresponde con la cuantificación específica realizada por dPCR; en ese sentido, se sugieren otras pruebas para evaluar la integridad del ácido nucleico.

Por ejemplo, una de las pruebas más utilizadas para analizar el grado de fragmentación está constituida por la amplificación de regiones Alu, estas regiones son pequeñas (aproximadamente 300 pares de bases), cuentan con alto %GC y están relacionadas a procesos de estabilidad genómica; por ello, son usadas en la predicción del progreso de tumor, así como en la evaluación diagnóstica y pronóstica del cáncer (Umetani et al., 2006a; Umetani et al., 2006b; Holdenrieder et al., 2008). La evaluación de estos fragmentos fue realizada por qPCR pero se podría evaluar un sistema de cuantificación con dPCR a fin de contrastar la resolución de los resultados obtenidos.

6.5 Aumento en los niveles de cfDNA

Se evaluaron los niveles de glucosa y concentración de linfocitos en sangre para descartar procesos infecciosos, linfocitosis o cuadros de hiperglucemia que puedan alterar el análisis de la cuantificación.

Del total de pacientes evaluados, solo 2 presentaron niveles de glucosa por encima de 100mg/dL de sangre y ninguna presentó más de 4000 linfocitos por microlitro de sangre (Anexo 3). Asimismo, la mayoría de pacientes presentan grupo sanguíneo O+ (66.7%), el cual ha sido descrito como el tipo sanguíneo con menor asociación a hipercolesterolemia y otras enfermedades que también elevan los niveles de cfDNA en plasma (Chen et al., 2014).

Entonces, las muestras analizadas no presentan linfocitosis ni casos de hiperglucemia, por consiguiente no es muy probable la lisis de linfocitos o la liberación de contenido celular de forma espontánea. Con esta información, se reduce la incertidumbre respecto a factores no cancerosos que puedan elevar los niveles de cfDNA.

6.6 Niveles de cfDNA entre controles y pacientes

Se encontraron diferencias entre pacientes con estadio I de cáncer de mama y controles no afectados. Los dos genes analizados son considerados como referenciales en la evaluación de la expresión en cáncer de mama (Zhong et al., 2007; Hindson et al., 2011; Chen et al., 2012; Figura 8), por lo que estos factores no afectarían los niveles de cfDNA que fueron reportados.

Los resultados obtenidos permiten diferenciar controles y pacientes a partir de una cuantificación con RNAsa P mayor a 8.53 ng/mL de plasma, lo que representa 10 veces el valor máximo en controles mostrado por Boni y colaboradores (2007). En otras comparaciones, Whale y colaboradores (2012) realizan un análisis del margen de detección empleando las tecnologías de la qPCR y dPCR; verificando una mayor sensibilidad y especificidad en la detección en la PCR cuantitativa digital.

En la búsqueda de un marcador referencial que pueda ser comparado con RNAsa P, se precisaba de una región cuya presencia en el DNA no esté influenciada por efectos propios de la transcripción, se eligió el gen PUM1 que es el más estable en cuanto a los niveles de expresión (Lyng et al., 2008; Kilic et al. 2014). Esto significaría que no habría un propósito intrínseco que afecte a los resultados de cuantificación de copias de DNA encontrados en plasma de pacientes.

Se encontró un elevado nivel de cfDNA en el gen PUM1, el cual propiciaría un mayor índice de expresión de la proteína de forma intrínseca; sin embargo, esto no sucede ya que se ha verificado que la expresión de la proteína PUM1 es estable en cáncer de mama (Figura 8).

6.7 Niveles de cfDNA en pacientes pre y post-operatorio

De acuerdo al origen y naturaleza del cfDNA en fluidos, se espera que los niveles de cfDNA se reduzcan significativamente después de haber extirpado el tumor a través de la operación quirúrgica; sin embargo, esto no es apreciable en la totalidad de resultados. En la Figura 22, se representan sutilmente las diferencias entre condiciones pre y post operatoria de pacientes, con valor-*p* mayor a 0.01 en ambos marcadores, lo cual no coincide con la hipótesis planteada para esta parte de la evaluación.

Debido a la complejidad del procedimiento de extracción y cuantificación de ácidos nucleicos, se podría inferir que las muestras fueron susceptibles a la contaminación, sin embargo, las cuantificaciones fueron realizadas en grupos de 4 a 20 muestras donde los casos en los que el cfDNA es elevado después de la operación son muy reducidos, en comparación con los valores obtenidos por

fluorimetría (Qubit), así como en la variación de concentración pre y post-operatoria.

Por ello, se estima que la diferencia experimental con la hipótesis se deba a un factor biológico, ya que el microambiente que circunda la región operada es blanco de múltiples procesos asociados a la recuperación del tejido, así como la reducción del trauma para el paciente. Es común el empleo de diversos fármacos en un ambiente post-quirúrgico y está verificado que también pueden ejercer efecto sobre el cfDNA (Swystun et al., 2011), incluso aquellos indicados para la quimioterapia, por lo que resultaría oportuno realizar una toma de muestra a un mayor tiempo post-operatorio. Además, es común encontrar referencias que expliquen de la segregación preferencial y permanente de regiones específicas según el tipo de cáncer (Hyun et al., 2016).

Asimismo, en el trabajo de Shaw y colaboradores (2012), se reportó la presencia de regiones de DNA mutado en pacientes participantes de un estudio realizado hasta 12 años después de la intervención quirúrgica, donde las pacientes no desarrollaron metástasis ni malestares asociados al cáncer de mama en el periodo de evaluación posterior, a pesar de contar con secuencias de DNA relacionadas al tumor.

En ese sentido, los resultados obtenidos cuentan como evidencia para determinar que la toma de muestras con una semana después de la operación, no sería un lapso temporal apropiado para observar resultados efectivos en la disminución de niveles de cfDNA. Por ello, se sugiere realizar la toma de muestra un mes después de la operación, en vista que dicha modificación ha propiciado mejores resultados en otros indicadores como el PSA en cáncer de próstata (Partin et al., 1993).

6.8 Nivel de cfDNA en controles

Por dato teórico, en un genoma humano estable, 300 copias de cualquier región presente, equivaldrían a 1 ng de DNA total (Cooper 2000); sin embargo, esta tasa de valores no es encontrada en el 76.4% de muestras que lograron cuantificarse con Qubit. Como se observa en la Figura 23, existe una distribución heterogénea entre los fragmentos de cfDNA extraído a partir de plasma humano. Una explicación alternativa la constituyen fuentes extrínsecas de cfNAs, producidas por agentes infecciosos presentes en el individuo (Long et al., 2016).

A partir de esa premisa, se obtienen niveles de cfDNA total entre 56.2 y 134.0 ng/mL de plasma para individuos normales cuantificados por fluorometría. Mientras que la cuantificación de controles por PCR digital reporta valores máximos de 13.17 y 8.53 ng/mL de plasma, según PUM1 y RNAsa P, respectivamente.

El valor referencial de cfDNA en controles contiene una controversia que implica un análisis de técnicas de extracción y cuantificación muy variables entre sí y que desde luego, afectan a los resultados. En la Tabla 2 se muestra un resumen de valores descritos como cantidad normal de cfDNA. Según esto, los criterios de evaluación aún no han sido estandarizados y cada técnica de forma independiente puede tener situaciones en las que se favorezcan o disminuya la concentración, por posible contaminación o baja sensibilidad en la detección.

A través de esta información, se corroboran y justifican los resultados expuestos en la presente tesis, asimismo, se contribuye a la formación de evidencia válida para ahondar los estudios en esta materia que involucra el análisis de variables en cfDNA en fluidos, su impacto en el desarrollo oncológico y las posibles mejoras en las técnicas de extracción, detección y cuantificación.

VIII. CONCLUSIONES

- El cfDNA es un biomarcador apropiado como herramienta diagnóstica en cáncer de mama.
- La extracción de cfDNA con perlas magnéticas es un método idóneo que asegura la mayor concentración y pureza de la muestra.
- La PCR digital está calificada para la cuantificación absoluta de cfDNA en muestras de pacientes y controles.
- Existen diferencias significativas entre niveles de cfDNA de pacientes con cáncer de mama y controles.

IX. RECOMENDACIONES

- Se requiere de un cuidado meticuloso en la extracción y cuantificación de cfDNA para evitar contaminación con DNA linfocitario y otros ácidos nucleicos.
- Se sugiere la toma de muestra postoperatoria en un tiempo mayor a 7 días luego de la intervención quirúrgica.
- Se sugiere realizar pruebas de integridad de cfDNA a través de la cuantificación de fragmentos Alu.
- Se sugiere la verificación de los valores obtenidos con un mayor número de muestras y la inclusión de estadios más avanzados de cáncer de mama.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarez, S., Añorbe, E., Alcorta, P., López, F., Alonso, I., & Cortés, J. (2006). Role of sonography in the diagnosis of axillary lymph node metastases in breast cancer: a systematic review. *American Journal of Roentgenology*, 186(5), 1342-1348.

Augustus, P. & Gabbur, N. (2014). The importance of human papillomavirus 16/18 genotype risk stratification in atypical squamous cells of undetermined significance in an inner-city urban hospital. *Obstetrics & Gynecology*, 123, 87S.

Bal de Kier Joffe, E., Puricelli, L., Mariotto, R., Eijan, A. M., & Sacerdote de Lustig, E. (1988). Fibronectin and laminin expression in breast cancer and lymph node metastases: lack of correlation with fibronectin plasmatic levels. *Medicina (B. Aires)*, 48(5), 499-505.

Bartsch, C., Bartsch, H., Fuchs, U., Lippert, T. H., Bellmann, O., & Gupta, D. (1989). Stage-dependent depression of melatonin in patients with primary breast cancer. *Cancer*, 64(2), 426-433.

Beaver, J., Jelovac, D., Balukrishna, S., Cochran, R., Croessmann, S., Zabransky, D., Wong, H., Valda Toro, P., Cidado, J., Blair, B., Chu, D., Burns, T., Higgins, M., Stearns, V., Jacobs, L., Habibi, M., Lange, J., Hurley, P., Lauring, J., VanDenBerg, D., Kessler, J., Jeter, S., Samuels, M., Maar, D., Cope, L., Cimino-Mathews, A., Argani, P., Wolff, A. and Park, B. (2014). Detection of Cancer DNA in Plasma of Patients with Early-Stage Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 20(10), pp.2643-2650.

Belgrader, P., Tanner, S., Regan, J., Koehler, R., Hindson, B. and Brown, A. (2013). Droplet Digital PCR Measurement of HER2 Copy Number Alteration in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Breast Carcinoma Tissue. *Clinical Chemistry*, 59(6), pp.991-994.

Beltrán Gárate, B., Huamán Guerrero, M., Osoreo Plenge, F., Palomino Portilla, A., Yabar Berrocal, A., Cotrina Montenegro, E., Gallo López, A. & Lopez-Hilasaca, M. (2009). Papiloma del virus humano de alto riesgo en cáncer de esófago escamoso: estudio clínico patológico retrospectivo durante el periodo

2003-2006 en el Hospital Edgardo Rebagliati Martins, EsSalud, Lima, Perú. *Acta Médica Peruana*, 26(2), 83-85.

Billi, S. (2002). Ribozimas: resabios del mundo primitivo. *Revista Electrónica de Ciencias Química Viva*, 1(1).

Boni, L., Cassinotti, E., Canziani, M., Dionigi, G., Rovera, F., & Dionigi, R. (2007). Free circulating DNA as possible tumour marker in colorectal cancer. *Surgical oncology*, 16, 29-31.

Breast Cancer (2016). Análisis para detectar el cáncer de mama: detección, diagnóstico y control. URL: <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/analisis/tipos>

Chen, C. T., Kim, H., Liska, D., Gao, S., Christensen, J. G., & Weiser, M. R. (2012). MET activation mediates resistance to lapatinib inhibition of HER2-amplified gastric cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 11(3), 660-669.

Chen, W., Cai, F., Zhang, B., Barekati, Z., & Zhong, X. Y. (2013). The level of circulating miRNA-10b and miRNA-373 in detecting lymph node metastasis of breast cancer: potential biomarkers. *Tumor Biology*, 34(1), 455-462.

Chen, Y., Chen, C., Ke, X., Xiong, L., Shi, Y., Li, J., Tan X. & Ye, S. (2014). Analysis of circulating cholesterol levels as a mediator of an association between ABO blood group and coronary heart disease. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, CIRCGENETICS-113.

Cooper GM. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. The Complexity of Eukaryotic Genomes. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9846/>

Couch, F. J., Wang, X., McGuffog, L., Lee, A., Olswold, C., Kuchenbaecker, K. B. & Hamann, U. (2013). Genome-wide association study in BRCA1 mutation carriers identifies novel loci associated with breast and ovarian cancer risk. *PLoS Genet*, 9(3), e1003212.

Dawson, S. J., Tsui, D. W., Murtaza, M., Biggs, H., Rueda, O. M., Chin, S. F. & Rosenfeld, N. (2013). Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 368(13), 1199-1209.

Durruthy, J., Ramathal, C., Sukhwani, M., Fang, F., Cui, J., Orwig, K., & Reijo Pera, R. (2014). Fate of induced pluripotent stem cells following transplantation to murine seminiferous tubules. *Human Molecular Genetics*, 23(12), 3071-3084. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddu012>

English, C., Merson, S. and Keer, J. (2006). Use of Elemental Analysis To Determine Comparative Performance of Established DNA Quantification Methods. *Analytical Chemistry*, 78(13), pp.4630-4633.

Fischbach, F. T., & Dunning, M. B. (2009). *A manual of laboratory and diagnostic tests*. Lippincott Williams & Wilkins. p83.

Forsheew, T., Murtaza, M., Parkinson, C., Gale, D., Tsui, D., Kaper, F., Dawson, S., Piskorz, A., Jimenez-Linan, M., Bentley, D., Hadfield, J., May, A., Caldas, C., Brenton, J. and Rosenfeld, N. (2012). Noninvasive Identification and Monitoring of Cancer Mutations by Targeted Deep Sequencing of Plasma DNA. *Science Translational Medicine*, 4(136), pp.136ra68-136ra68.

Fredrikson, G., Hedblad, B., Nilsson, J., Alm, R., Berglund, G., & Nilsson, J. (2004). Association between diet, lifestyle, metabolic cardiovascular risk factors, and plasma C-reactive protein levels. *Metabolism*, 53(11), 1436-1442.

Gallagher, S. R., & Desjardins, P. R. (2007). Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Current Protocols in Human Genetics*, A-3D.

García, D. L. T. N., Fernández-Durango, R., Gómez, R., Fuentes, M., Roldán-Pallarés, M., Donate, J. & Calle-Pascual, A. L. (2015). Expression of Angiogenic MicroRNAs in Endothelial Progenitor Cells From Type 1 Diabetic Patients With and Without Diabetic Retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(6), 4090-4098.

Garcia-Closas, M., Couch, F. J., Lindstrom, S., Michailidou, K., Schmidt, M. K., Brook, M. N. & Swerdlow, A. (2013). Genome-wide association studies identify

four ER negative-specific breast cancer risk loci. *Nature genetics*,45(4), 392-398.

Gestión (2016). Cáncer en Perú. Retrieved 7 February 2017, from <http://gestion.pe/tendencias/cancer-peru-85-casos-se-detectan-estadios-avanzados-2154023>

Gevensleben, H., Garcia-Murillas, I., Graeser, M., Schiavon, G., Osin, P., Parton, M., Smith, I., Ashworth, A. and Turner, N. (2013). Noninvasive Detection of HER2 Amplification with Plasma DNA Digital PCR. *Clinical Cancer Research*, 19(12), pp.3276-3284.

Giacona, M., Ruben, G., Iczkowski, K., Roos, T., Porter, D., & Sorenson, G. (1998). Cell-Free DNA in Human Blood Plasma: Length Measurements in Patients with Pancreatic Cancer and Healthy Controls. *Pancreas*, 17(1), 89-97.

Gould, T., Vu, T., Swystun, L., Dwivedi, D., Mai, S., Weitz, J., & Liaw, P. (2014). Neutrophil Extracellular Traps Promote Thrombin Generation Through Platelet-Dependent and Platelet-Independent Mechanisms. *Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology*, 34(9), 1977-1984. <http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.114.304114>

Gutschner, T., Hämmerle, M., Eißmann, M., Hsu, J., Kim, Y., Hung, G. & Diederichs, S. (2013). The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer research*, 73(3), 1180-1189.

Hayat, M. (2013). Tumor dormancy, quiescence, and senescence. pp.36-37.

Heredia, N. J., Belgrader, P., Wang, S., Koehler, R., Regan, J., Cosman, A. M. & Karlin-Neumann, G. (2013). Droplet Digital™ PCR quantitation of HER2 expression in FFPE breast cancer samples. *Methods*, 59(1), S20-S23.

Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J. & Colston, B. W. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical chemistry*, 83(22), 8604-8610.

Holdenrieder, S., Burges, A., Reich, O., Spelsberg, F. and Stieber, P. (2008). DNA Integrity in Plasma and Serum of Patients with Malignant and Benign Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1137(1), pp.162-170.

Houssami, N., Ciatto, S., Macaskill, P., Lord, S. J., Warren, R. M., Dixon, J. M., & Irwig, L. (2008). Accuracy and surgical impact of magnetic resonance imaging in breast cancer staging: systematic review and meta-analysis in detection of multifocal and multicentric cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(19), 3248-3258.

Howe, J. R., Klimstra, D. S., & Cordon-Cardo, C. (1997). DNA extraction from paraffin-embedded tissues using a salting-out procedure, a reliable method for PCR amplification of archival material.

Huamán Guerrero, M., Beltrán Gárate, B., Osorio Plenge, F., Palomino Portilla, A., & Jáuregui Francia, F. (2008). Cáncer de esófago y papilomavirus humano 16 en un paciente trasplantado renal del Hospital Edgardo Rebagliati Martins, Lima, Perú: primer reporte latinoamericano de un caso y revisión de la literatura. *Acta Médica Peruana*, 25(4), 224-227.

Hyun, K., Kim, J., Gwak, H., & Jung, H. (2016). Isolation and enrichment of circulating biomarkers for cancer screening, detection, and diagnostics. *The Analyst*, 141(2), 382-392.

ICP-OES. (2017). [online] *Laboratoriotecnicasinstrumentales.es*. Available at: <http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/espectroscopia-de-plasma-icp-oes> [Accessed 22 Feb. 2017].

INEN (2011) Neoplasias Malignas Más Frecuentes, período 1985-2011. URL : http://www.inen.sld.pe/portal/documentos/pdf/estadistica/datos_estadisticos/22042013_NEOPLASIAS_MALIGNAS_FRECUENTES_1985.pdf

INEN (2013). Logros del INEN con el plan Esperanza. URL : http://www.inen.sld.pe/portal/documentos/pdf/institucional/Memoria/25022014_Logros_INEN_Plan_Esperanza_a_dic_2013.pdf

Jiang, Ma, J., Li, N. & Guarnera, M. (2013). Quantification of Plasma miRNAs by Digital PCR for Cancer Diagnosis. *Biomarker Insights*, p.127.

Kalisky, T., & Quake, S. R. (2011). Single-cell genomics. *Nature methods*,8(4), 311-314.

Kamat, A. A., Sood, A. K., Dang, D., Gershenson, D. M., Simpson, J. L., & Bischoff, F. Z. (2006). Quantification of Total Plasma Cell-Free DNA in Ovarian Cancer Using Real-Time PCR. *Annals of the New York Academy of Sciences*,1075(1), 230-234.

Kiebert, G. M., De Haes, J. C., & Van de Velde, C. J. (1991). The impact of breast-conserving treatment and mastectomy on the quality of life of early-stage breast cancer patients: a review. *Journal of Clinical Oncology*, 9(6), 1059-1070.

Kılıç, Y., Celebiler, A. C., & Sakızlı, M. (2014). Selecting housekeeping genes as references for the normalization of quantitative PCR data in breast cancer. *Clinical and Translational Oncology*, 16(2), 184-190.

Kim, K., Shin, D., Park, M., Baik, S., Kim, T., Kim, S., & Lee, S. (2014). Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. *Annals Of Surgical Treatment And Research*, 86(3), 136.

Kinugasa, H., Ikeda, F., Takaguchi, K., Mori, C., Matsubara, T., Shiraha, H. & Yamamoto, K. (2015). Low frequency of drug-resistant virus did not affect the therapeutic efficacy in daclatasvir plus asunaprevir therapy in patients with chronic HCV genotype 1 infection. *Antiviral therapy*.

Leeb, M., Dietmann, S., Paramor, M., Niwa, H., & Smith, A. (2014). Genetic Exploration of the Exit from Self-Renewal Using Haploid Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 14(3), 385-393.

Liga contra el Cáncer (2016). Liga Cáncer URL : <http://www.ligacancer.org.pe>

Long, Y., Zhang, Y., Gong, Y., Sun, R., Su, L., Lin, X., Shen, A., Zhou, J., Caiji, Z., Wang, X., Li, D., Wu, H. & Li, D. (2016). Diagnosis of Sepsis with Cell-free DNA by Next-Generation Sequencing Technology in ICU Patients. *Archives of Medical Research*, 47(5), 365-371.

Lyng, M. B., Lænkholm, A. V., Pallisgaard, N., & Ditzel, H. J. (2008). Identification of genes for normalization of real-time RT-PCR data in breast carcinomas. *BMC cancer*, 8(1), 20.

Medline Plus - Información de Salud de la Biblioteca Nacional de Medicina. (2016). Medlineplus.gov. Retrieved 8 August 2016, from <https://medlineplus.gov/spanish/>

Michailidou, K., Hall, P., Gonzalez-Neira, A., Ghoussaini, M., Dennis, J., Milne, R. L. & Wessels, L. F. (2013). Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk. *Nature genetics*, 45(4), 353-361.

Miller, S., Dykes, D., & Polesky, H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res*, 16(3), 1215-1215.

MINSA (2011). Guía de práctica clínica : Cáncer de mama. Lima; Perú. Ministerio de Salud; 1 ed.; 2011. 129 p.

MINSA (2012). Esperanza : Plan Nacional de Cáncer. URL : <http://www.minsa.gob.pe/portada/Especiales/2012/esperanza/>

Mouliere, F., El Messaoudi, S., Gongora, C., Guedj, A. S., Robert, B., Del Rio, M. & Thierry, A. R. (2013). Circulating cell-free DNA from colorectal cancer patients may reveal high KRAS or BRAF mutation load. *Translational oncology*, 6(3), 319-IN8.

Nicklas, J. & Buel, E. (2003). Quantification of DNA in forensic samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 376(8), pp.1160-1167.

Nishimoto, S., Fukuda, D., Higashikuni, Y., Tanaka, K., Hirata, Y., Murata, C., Kim-Kaneyama, J., Sato, F., Bando, M., Yagi, S., Soeki, T., Hayashi, T., Imoto, I., Sakaue, H., Shimabukuro, M. and Sata, M. (2016). Obesity-induced DNA released from adipocytes stimulates chronic adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Science Advances*, 2(3), pp.e1501332-e1501332.

Norton, S., Lechner, J., Williams, T., & Fernando, M. (2013). A stabilizing reagent prevents cell-free DNA contamination by cellular DNA in plasma during

blood sample storage and shipping as determined by digital PCR. *Clinical Biochemistry*, 46(15), 1561-1565.

Omim (2016). OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. [online] Available at: <http://www.omim.org/> [Accessed 4 Aug. 2016].

OMS (2011) Breast Cancer : prevention and control. URL : <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.htm>

OMS (2014). Resumen estadístico del Observatorio de Salud. Perú 2002-2014. URL : <http://apps.who.int/gho/data/node.country.country-PER?lang=en>

Oncosalud. (2017). Prevención, Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer - Oncosalud. Retrieved 2 March 2017, from <https://www.oncosalud.pe/>

Oxnard, G. R., Paweletz, C. P., Kuang, Y., Mach, S. L., O'Connell, A., Messineo, M. M. & Jänne, P. A. (2014). Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clinical Cancer Research*, 20(6), 1698-1705.

Partin, A. W., Getzenberg, R. H., CarMichael, M. J., Vindivich, D., Yoo, J., Epstein, J. I., & Coffey, D. S. (1993). Nuclear matrix protein patterns in human benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Cancer research*, 53(4), 744-746.

Poelcher, M., Ellinger, J., Willems, S., El-Maarri, O., Hoeller, T., Amann, C., ... & Braun, M. (2010). Impact of the menstrual cycle on circulating cell-free DNA. *Anticancer research*, 30(6), 2235-2240.

Schito, L., Rey, S., Tafani, M., Zhang, H., Wong, C. C. L., Russo, A. & Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression of platelet-derived growth factor B promotes lymphatic metastasis of hypoxic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(40), E2707-E2716.

Schwarzenbach, H., Hoon, D. and Pantel, K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer*, 11(6), pp.426-437.

Shaw, J. A., Page, K., Blighe, K., Hava, N., Guttery, D., Ward, B. & Coombes, R. C. (2012). Genomic analysis of circulating cell-free DNA infers breast cancer dormancy. *Genome research*, 22(2), 220-231.

Schmidt, B., Weickmann, S., Witt, C., & Fleischhacker, M. (2005). Improved method for isolating cell-free DNA. *Clinical chemistry*, 51(8), 1561-1563.

Siu, A. (2016). Screening for Breast Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Annals Of Internal Medicine*, 164(4), 279. <http://dx.doi.org/10.7326/m15-2886>

Sociedad Americana del Cáncer (2016). SAC: Tipos de cáncer de seno. URL : <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdeseno/guiadetallada/cancer-de-seno-what-is-breast-cancer-types>

Sociedad Americana del Cáncer (2017). SAC : Estadios de Cáncer de mama. URL : <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/stages-of-breast-cancer.html>

Sparks, A. B., Wang, E. T., Struble, C. A., Barrett, W., Stokowski, R., McBride, C., Zahn J, Lee K, Shen N, Doshi J, Sun M, Garrison J, Sandler J, Hollemon D, Pattee P, Tomita-Mitchell A, Mitchell M, Stuelpnagel J, Song K, & Sun, M. (2012). Selective analysis of cell-free DNA in maternal blood for evaluation of fetal trisomy. *Prenatal diagnosis*, 32(1), 3-9.

Spindler, K. L. G., Appelt, A. L., Pallisgaard, N., Andersen, R. F., Brandslund, I., & Jakobsen, A. (2014). Cell-free DNA in healthy individuals, noncancerous disease and strong prognostic value in colorectal cancer. *International Journal of Cancer*, 135(12), 2984-2991.

Steinberg, K., Beck, J., Nickerson, D., Garcia-Closas, M., Gallagher, M., Caggana, M., Reid Y, Cosentino M, Ji J, Johnson D, Hayes RB, Earley M, Lorey F, Hannon H, Khoury MJ & Hayes, R. B. (2002). DNA banking for epidemiologic studies: a review of current practices. *Epidemiology*, 13(3), 246-254.

Swystun, L. L., Mukherjee, S., & Liaw, P. C. (2011). Breast cancer chemotherapy induces the release of cell-free DNA, a novel procoagulant stimulus. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9(11), 2313-2321.

Takeuchi, H., Saitoh, S., Takagi, S., Ohnishi, H., Ohhata, J., Isobe, T., & Shimamoto, K. (2005). Metabolic syndrome and cardiac disease in Japanese men: applicability of the concept of metabolic syndrome defined by the National Cholesterol Education Program—Adult Treatment Panel III to Japanese men—the Tanno and Sobetsu Study. *Hypertension research*, 28(3), 203-208.

Taly, V., Pekin, D., Benhaim, L., Kotsopoulos, S. K., Le Corre, D., Li, X. & Laurent-Puig, P. (2013). Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clinical chemistry*, 59(12), 1722-1731.

Thermo Scientific. (2017a). 7500 and 7500 Fast Real-Time PCR Systems Support—Getting Started - ThermoFisher.com. Retrieved 23 February 2017, from <https://www.thermoFisher.com/pe/en/home/technical-resources/technical-reference-library/real-time-digital-PCR-instruments-support-center/7500-real-time-pcr-systems-support/7500-real-time-pcr-systems-support-getting-started.html>

Thermo Scientific. (2017b). DNA quantitation in cuvette and Tray Cell using the Thermo Scientific Multiskan GO spectrophotometer. [online] Available at: <https://goo.gl/7uc7UA> [Accessed 22 Feb. 2017].

Theodoro, T. R., de Matos, L. L., Anna, A. V. L. S., Fonseca, F. L. A., Semedo, P., Martins, L. C. & da Silva Pinhal, M. A. (2007). Heparanase expression in circulating lymphocytes of breast cancer patients depends on the presence of the primary tumor and/or systemic metastasis. *Neoplasia*, 9(6), 504-510.

Torres, C. S., Acevedo, B. J. C., Aguirre, D. B., Aliaga, M. N., Cereceda, G. L., Dagnino, U. B. & Schwartz, J. R. (2013). Estado del arte el diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 588-609.

Tozawa, M., Iseki, C., Tokashiki, K., Chinen, S., Kohagura, K., Kinjo, K. & Iseki, K. (2007). Metabolic syndrome and risk of developing chronic kidney disease in Japanese adults. *Hypertension Research*, 30(10), 937-943.

UGSC. (2017). dsDNA copy number calculator. Cels.uri.edu. Retrieved 28 February 2017, from <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>

Umetani, N., Kim, J., Hiramatsu, S., Reber, H. A., Hines, O. J., Bilchik, A. J., & Hoon, D. S. (2006a). Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clinical chemistry*, 52(6), 1062-1069.

Umetani, N., Giuliano, A. E., Hiramatsu, S. H., Amersi, F., Nakagawa, T., Martino, S., & Hoon, D. S. (2006b). Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *Journal of clinical oncology*, 24(26), 4270-4276.

Van Deurzen, C. H., de Boer, M., Monninkhof, E. M., Bult, P., Van der Wall, E., Tjan-Heijnen, V. C., & Van Diest, P. J. (2008). Non-sentinel lymph node metastases associated with isolated breast cancer cells in the sentinel node. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(22), 1574-1580.

Vandereijk, A., Niesters, H., Gotz, H., Janssen, H., Schalm, S., Osterhaus, A., & Deman, R. (2004). Paired measurements of quantitative hepatitis B virus DNA in saliva and serum of chronic hepatitis B patients: implications for saliva as infectious agent. *Journal Of Clinical Virology*, 29(2), 92-94. [http://dx.doi.org/10.1016/s1386-6532\(03\)00092-1](http://dx.doi.org/10.1016/s1386-6532(03)00092-1)

Walter, K., Holcomb, T., Januario, T., Du, P., Evangelista, M., Kartha, N. & Shames, D. S. (2012). DNA methylation profiling defines clinically relevant biological subsets of non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 18(8), 2360-2373.

Wang, J., Ramakrishnan, R., Tang, Z., Fan, W., Kluge, A., Dowlati, A. & Ma, P. C. (2010). Quantifying EGFR alterations in the lung cancer genome with nanofluidic digital PCR arrays. *Clinical chemistry*, 56(4), 623-632.

Whale, A., Huggett, J., Cowen, S., Speirs, V., Shaw, J., Ellison, S., Foy, C. and Scott, D. (2012). Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation. *Nucleic Acids Research*, 40(11), pp.e82-e82.

Weerakoon, K. & McManus, D. (2016). Cell-Free DNA as a Diagnostic Tool for Human Parasitic Infections. *Trends In Parasitology*, 32(5), 378-391.

Wren, B. (2007). The origin of breast cancer. *Menopause, PAP*. <http://dx.doi.org/10.1097/gme.0b013e31803816db>

Xue, X., Teare, M., Holen, I., Zhu, Y., & Woll, P. (2009). Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clinica Chimica Acta*, 404(2), 100-104.

Yung, T. K., Chan, K. A., Mok, T. S., Tong, J., To, K. F., & Lo, Y. D. (2009). Single-molecule detection of epidermal growth factor receptor mutations in plasma by microfluidics digital PCR in non-small cell lung cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 15(6), 2076-2084.

Zaravinos, A., Tzoras, S., Apostolakis, S., Lazaridis, K., & Spandidos, D. A. (2011). Levosimendan reduces plasma cell-free DNA levels in patients with ischemic cardiomyopathy. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 31(2), 180-187.

Zhang, S., Lu, X., Shu, X., Tian, X., Yang, H., Yang, W., Zhang, Y. and Wang, G. (2014). Elevated Plasma cfDNA May be Associated with Active Lupus Nephritis and Partially Attributed to Abnormal Regulation of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Intern. Med.*, 53(24), pp.2763-2771.

Zhong, X. Y., Ladewig, A., Schmid, S., Wight, E., Hahn, S., & Holzgreve, W. (2007). Elevated level of cell-free plasma DNA is associated with breast cancer. *Archives of gynecology and obstetrics*, 276(4), 327-331.

XI. ANEXOS

ANEXO 1. Consentimiento informado y ficha de registro



La Molina, 23 de junio de 2015

Oficio No. 826 - 2015 - CIEI-USMP-CCM

Señor Doctor
José Luis Buleje Sono
Laboratorio de Genética y Biología Molecular
Facultad de Medicina Humana - USMP
Presente

Ref. Proyecto: "Test genético-epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos circulantes (ctNAs) como biomarcadores, predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento."

De mi consideración:

Es grato expresarle mi cordial saludo y a la vez informarle que en cumplimiento de las buenas prácticas clínicas y la legislación peruana vigente en materia de investigación científica en el campo de la salud, el Comité de mi presidencia, en la sesión del 23 de junio evaluó y aprobó los siguientes documentos:

- Proyecto: "Test genético-epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos circulantes (ctNAs) como biomarcadores, predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento."
- Hoja Informativa para el Paciente

Es cuanto informo a usted para su conocimiento y fines que correspondan.

Atentamente,



Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité de Bioética e Investigación Científica
de la Universidad San Martín de Porres - Lima, Perú

AVIARQ04
Adjunto (2) documentos scilabos

HOJA INFORMATIVA PARA EL PACIENTE

Nombre del estudio:

TEST GENÉTICO - EPIGENÉTICO NO INVASIVO PARA CÁNCER DE MAMA UTILIZANDO ÁCIDOS NUCLEICOS CIRCULANTES (cfNAs) COMO BIOMARCADORES, PREDICTORES DE PRONÓSTICO Y RESPUESTA A TRATAMIENTO.

Patrocinadores del estudio: Universidad de San Martín de Porres, Oncosalud-AUNA.

Investigador principal: José Luis Buleje Sono

Investigador responsable en la USMP: Ricardo Miguel Fujita Alarcón

Investigador responsable en Oncosalud-AUNA: Alfredo Aguilar Cartagena

Sedes de estudio: Laboratorio de Genética y Biología Molecular. Facultad de Medicina Humana. Universidad de San Martín de Porres; Unidad de Mama, Oncosalud-AUNA

Estimado Señor(a):

Estamos realizando un trabajo científico que servirá en el futuro para el mejor tratamiento de cáncer y queremos invitarlo a participar. Este documento conocido como *Consentimiento Informado*, sirve para informarle de los alcances y detalles de nuestro proyecto y le ayudará en su decisión de participar en el estudio. Lea cuidadosamente el presente documento y haga las preguntas a los médicos y miembros del equipo para realizar un estudio genético. Ud. debe firmar solo si ha entendido toda la información.

Los patrocinadores del estudio son Universidad de San Martín de Porres y Oncosalud-AUNA, que tienen como algunas de sus metas, la investigación científica en las poblaciones peruanas, así como y la extensión universitaria a la sociedad en colaboración con Oncosalud-AUNA.

Acerca del estudio

La información científica indica que en el cáncer es una enfermedad donde se encuentran involucrados una serie de genes. Los genes portan las características que recibimos de nuestros padres, abuelos y otros ancestros y que transmitimos a nuestros hijos como es el caso de los rasgos físicos, el color de la piel, de los ojos, del tipo de cabello y otros como el funcionamiento normal de las células. En muchos tipos de cáncer las células sufren cambios de la información genética (mutaciones y alteraciones epigenéticas) y hacen que se expresen de manera anormal y proliferen sin control. Estos cambios pueden ser detectados por las técnicas usadas en esta investigación y esa información puede servir para el diagnóstico, tratamiento y pronóstico del cáncer. El ADN de las células del cuerpo pueden ser detectadas en el plasma sanguíneo y eso ocurre también para las células tumorales.

Este proyecto involucra el estudio de pacientes con cáncer de mama (n=100) y sus respectivos controles sanos (n=100) y tiene una duración de 30 meses; siendo los criterios de inclusión y exclusión los siguientes:

Criterios de Inclusión

Pacientes recientemente diagnosticados con cáncer de mama. Mayores de 18 años y sin tratamiento previo. Firma de consentimiento informado. Controles: Pacientes sin cáncer de mama.



Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente

Comité Institucional de Ética e Investigación



Criterios de Exclusión

Paciente con tratamiento previo; no aceptación de consentimiento informado.

Le invitamos a participar porque nos ayudará a conocer las variantes genéticas asociadas con cáncer de mama en nuestra población. Este es un trabajo de investigación científica y su participación va a ser importante, por ahora no obtendrá un beneficio directo. Sin embargo, la identificación de posibles factores genéticos relacionados con la forma cómo las células cancerosas escapan del control de la proliferación, será de suma importancia. Además, permitirá establecer el pronóstico de la enfermedad de acuerdo a los tipos de alteraciones encontradas. Esto podría beneficiar en un futuro a otros pacientes porque permitirá identificar a la enfermedad antes que se pueda detectar clínicamente. Ello también contribuirá a un mejor conocimiento y tratamiento del cáncer de mama en las mujeres peruanas.

¿Por qué hacer el estudio?

En un futuro próximo, conociendo las variantes genéticas de los tumores se les podrán detectar oportunamente y escoger desde un principio el mejor medicamento de acuerdo a su constitución genética.

El estudio se realizará en el laboratorio mediante el análisis de la molécula de ADN. Dichos análisis buscan determinar la presencia de variaciones en el ADN que puedan ser causales de la enfermedad y/o ser susceptibles a tratamiento.

¿Qué se me pedirá?

Si usted decide participar se le solicitará 10 ml de sangre obtenido por venopunción y una muestra de tumor fresco y/o tumor conservado en parafina (lo que no influirá en el estudio patológico de su enfermedad). Usted puede donar el sobrante de su muestra para que en lugar de ser destruido, sea utilizado en investigación relacionada con el cáncer.

Su participación en este estudio es voluntaria. Por otra parte, la realización del estudio genético será gratuita, y no recibirá ningún tipo de compensación económica o de cualquier otro tipo por su participación. Si decide no participar en este estudio, esto no cambiará la calidad de la atención recibida.

¿Qué riesgos de salud implica este estudio?

La muestra será de sangre intravenosa por lo que las dificultades son el pinchazo y algunas veces se forma hematomas.

Se le pedirá su consentimiento para que con su muestra se haga:

1.- Estudio de genes específicos de este proyecto (HER2, PIK3CA, TP53, RASSF1A, MAL, SFRP1, GSTP1, RARB2 y varios miRNAs, etc.) que pueden estar involucrados en el tratamiento y pronóstico de la enfermedad que usted padece. Si usted lo solicita, su muestra solo servirá para este proyecto y una vez finalizado el estudio, será destruida.

2.- Autorizar al Investigador a almacenar su muestra de ADN para futuros estudios que asocien otros genes relacionados con el desarrollo y tratamiento de cáncer, puedan ser procesados.

¿Qué se harán con los resultados del estudio?


Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres - Lima - Perú

Su resultado será analizado junto con los de otras pacientes para realizar el análisis del efecto de diferentes variantes en el tratamiento de cáncer. Los resultados del estudio no influirán en el manejo de su enfermedad.

Confidencialidad

Por tratarse de un estudio genético de participación confidencial, su identidad siempre será preservada de forma confidencial. Su nombre será cambiado por un código de números y letras para uso de laboratorio, así sus datos personales no serán conocidos fuera de este trabajo. Toda la información relacionada con el estudio es estrictamente confidencial y tratada de acuerdo a las leyes peruanas de Protección de Datos Personales (Ley N 29733).

Preguntas o quejas

Para cualquier duda usted puede comunicarse con:

Dr. José Buleje Sono, Investigador del CGBM, FMH-USMP, investigador principal del proyecto, teléfono oficina: 3652300 anexo 152, celular 985225663. Correo electrónico: jbulejes@usmp.pe, Av. Alameda del Corregidor No 1531 Urb. Los Sirius, La Molina.

Dr. Alfredo Aguilar, Médico oncólogo, Director Científico de Oncosalud-AUNA. Teléfono oficina: 5137900 anexo 1292, Correo electrónico: aaguilar@oncosalud.pe, Av. Guardia Civil 571, San Borja.

Dr. Ricardo Fujita A., Director CGBM, FMH-USMP, investigador responsable del estudio, teléfono oficina: 3652300 anexo 152, celular 997054985. Correo electrónico: rfujitaa@usmp.pe, Av. Alameda del Corregidor No 1531 Urb. Los Sirius, La Molina.

En caso de duda puede resolverla con:

Dr. Amador Vargas Guerra, Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad de San Martín de Porres- Clínica CadaMujer, quien vigila que la ejecución del proyecto sea bajo las normas éticas establecidas en el Perú. Teléfono: 3350483 anexo160, celular 999098514. Correo electrónico: etica_fmh@usmp.pe, Av. Alameda del Corregidor No 1531 Urb. Los Sirius, La Molina.

Declaración del Paciente

"He leído y entendido la información prestada y escrita en este documento. También afirmo que he tenido la oportunidad de hacer algunas preguntas y resolver algunas dudas. Por lo que acepto libre y voluntariamente participar en esta investigación"


Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres

CONSENTIMIENTO INFORMADO DE ESTUDIO GENÉTICO:

Test genético - epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos circulantes (cfNAs) como biomarcadores, predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento.

Nombre:
Fecha: Edad:
DNI: Teléfono: No de Registro:
Médico tratante:
Hospital Referencia:

He recibido información de forma verbal y escrita sobre el proyecto **Test genético - epigenético no invasivo para cáncer de mama utilizando ácidos nucleicos circulantes (cfNAs) como biomarcadores, predictores de pronóstico y respuesta a tratamiento.**

De acuerdo a esta información he entendido que:

- 1.- Se me va a extraer una muestra de sangre periférica para realizar un estudio genético.
- 2.- El objetivo de dicho estudio es analizar los genes que están implicados en el cáncer, su respuesta a tratamiento y pronóstico.
- 3.- Los resultados del estudio no influirán en el manejo de la enfermedad.
- 4.- Se guardará la confidencialidad de los resultados del estudio, pudiéndose utilizar los datos de forma anónima para estudios epidemiológicos.
- 5.- Si creo conveniente, puedo anular el consentimiento así como solicitar que se destruyan las muestras extraídas.

Leído el documento **CONSIENTO** que se me extraiga una muestra para realizar el estudio genético.

Lima, _____ de _____ del 201_

Firma del paciente

Firma del Investigador

 
Dr. Amador Vargas Guerra
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
de la Universidad de San Martín de Porres - Clínica CarWPA



ANEXO 2. Información clínica de pacientes

Código	Estadio De Cáncer	Fecha Operación	Fecha Muestra Pre-Cirugía	Fecha Muestra Post-Cirugía	Edad	Histología (Ductal/Lobular/ Metaplásico)	ER	PR	HER2	Conc. Linfocitos (Cel/UI)	Gpo Sanguíneo	Glucosa (Mg/Dl)
Fincyt-002-15	IIIA	24/05/2016	17/05/2016	31/05/2016	42	Ductal	+	+	-	2927.4	O+	93
Fincyt-003-15	IA	23/11/2015	23/11/2015	27/11/2015	65	Lobulillar	+	-	-	2285.4	A+	98
Fincyt-004-15	IA	28/11/2015	25/11/2015	4/12/2015	61	Lobulillar	+	+	-	1684.8	O-	81
Fincyt-005-15	IIIA	11/12/2015	26/11/2015	18/12/2015	46	Ductal	+	+	+	1000.5	O+	93
Fincyt-006-15	IA	5/12/2015	30/11/2015	11/12/2015	72	Ductal	+	+	-	720.0	O+	88
Fincyt-007-15	IIA	12/12/2015	02/12/2015	18/12/2015	45	Ductal	-	-	+	2023.1	O+	89
Fincyt-008-15	IA	05/12/2015	05/12/2015	11/12/2015	61	Mixto	-	-	+	1650.0	O+	116
Fincyt-009-15	IIA	14/12/2015	14/12/2015	22/12/2015	28	Ductal	+	+	-	3773.6	O+	94
Fincyt-010-15	IA	15/12/2015	15/12/2015	6/1/2016	52	Mixto	+	+	-	1872.0	A+	94
Fincyt-012-15	IA	22/02/2016	11/01/2016	04/03/2016	65	Ductal	+	-	-	2167.3	O+	94
Fincyt-013-15	IA	22/02/2016	27/01/2016	01/03/2016	80	Ductal	-	-	-	949.2	O+	90
Fincyt-014-15	IA	29/01/2016	29/01/2016	09/02/2016	42	Ductal	+	+	-	2107.0	A+	69
Fincyt-015-15	IA	08/04/2016	11/03/2016	19/04/2016	68	Lobulillar	+	+	-	2428.8	O+	94
Fincyt-016-15	IA	30/03/2016	29/03/2016	14/04/2013	60	Ductal	+	-	+	1157.7	O+	120
Fincyt-017-15	IIB	11/06/2016	07/06/2016	04/07/2016	70	Ductal	+	+	+	1462.1	A+	99
Fincyt-018-16	IIIC	28/06/2016	28/06/2016	06/07/2016	38	Ductal	+	+	-	1278.0	O+	80

ANEXO 3. Descripción general de la población estudiada

Se evaluaron 16 pacientes entre 28 y 80 años, con una edad media de 57.71 años. No se encontró asociación entre edad y el tipo de histología ($p= 0.765$), o la concentración de glucosa ($p= 0.2048$); en contraste, se halló una tendencia a disminuir la concentración de linfocitos con un valor estadístico igual a 0.0782. En ningún caso se evidenció linfocitosis, de acuerdo al Manual de Laboratorio y Test de Diagnóstico por Fischbach y Dunning (2009) que indica 4000 células por microlitro como valor máximo (Figura A).

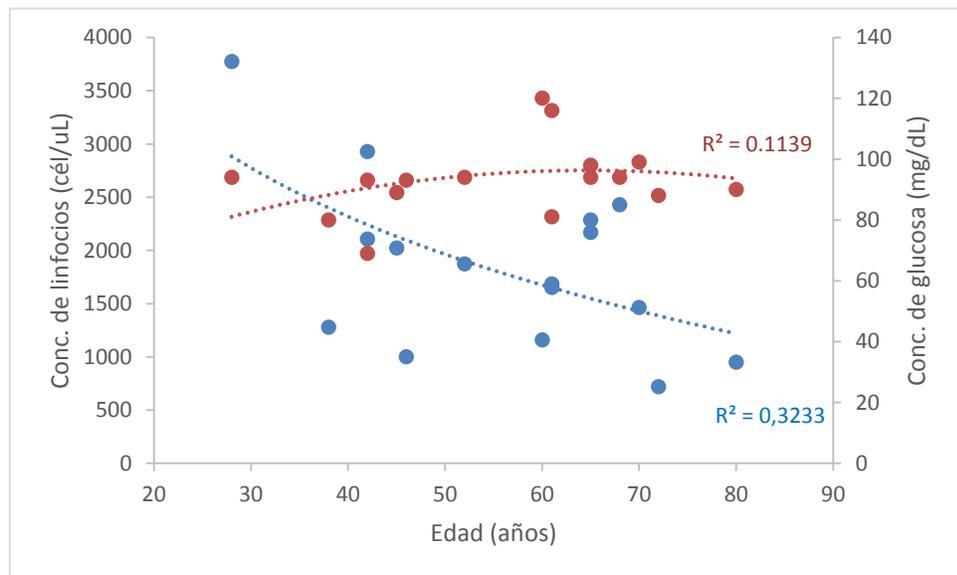


Figura A. Concentración de linfocitos y glucosa en función a la edad de las pacientes. No se encuentra asociación entre edad e hiperglucemia en las pacientes evaluadas ($p= 0.2048$).

Igualmente, no se encontró asociación estadística entre la cantidad de linfocitos y el grupo sanguíneo de pacientes ($p=0.913$), donde se obtuvo los siguientes resultados: 11 pacientes presentaron grupo O⁺; 4, grupo A⁺ y 1, grupo O⁻. Estos grupos tampoco generan aporte estadístico a la concentración de glucosa en las muestras analizadas ($p= 0.486$).

Respecto a los tipos de cáncer de mama, 12 individuos presentaron cáncer ductal; 2, lobulillar y 2, mixto. Se encontraron diferencias entre la presencia de receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR) y HER2, asociadas con los valores de glucosa ($p=0.0492$), en este caso, el mayor valor de glucosa en sangre se halló en una persona con ER y HER2 positivos (Tabla A, Figura B).

Tabla A. Patrón de combinaciones entre las respuestas a marcadores bioquímicos.

Combinación	ER	PR	HER2	Número de pacientes
A	+	+	+	3
B	+	+	-	8
C	+	-	+	1
D	+	-	-	2
E	-	+	+	0
F	-	+	-	0
G	-	-	+	2
H	-	-	-	0

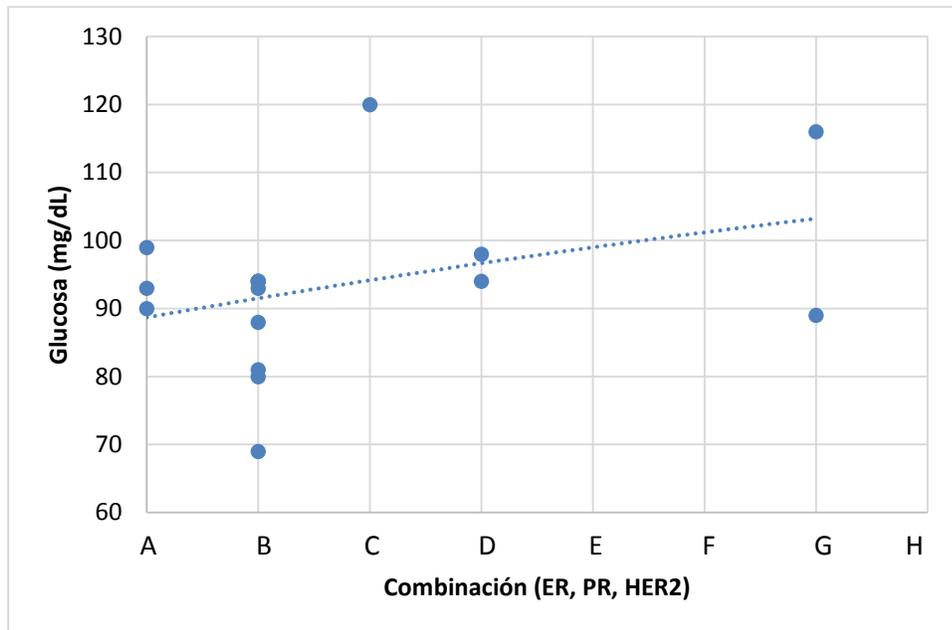


Figura B. Concentración de glucosa en función a la combinación de marcadores bioquímicos. Los valores más altos de glucosa se encuentran en pacientes HER2 positivo.

Se encontraron 2 casos, con aparente hiperglucemia leve (valores mayores a 100mg/dL), esto se consideró en la evaluación de los valores de cfDNA, un resumen de los datos clínicos de los pacientes se muestra en la Tabla B.

Respecto al grupo control, conformado por 21 mujeres, tienen una edad entre 37 y 73 años, con un promedio de 48.69 ± 9.78 años. Todas negaron presentar algún estadio de cáncer de mama o antecedentes familiares asociados.

Tabla B. Información clínica descriptiva de las pacientes participantes.

Característica	Número (%)
Edad (media \pm D.E.)	55.94 \pm 14.46
Tipo de cáncer	
Ductal	11(68.75)
lobulillar	3(18.75)
Mixto	2(12.5)
Estadio	
I	10 (62.5)
II	3 (18.75)
III	3 (18.75)
Estado ER	
positivo	14(87.5)
negativo	2(12.5)
Estado PR	
positivo	11(68.75)
negativo	5(31.25)
Estado HER2	
positivo	6(37.5)
negativo	10(62.5)

ER, receptor de estrógeno; PR, receptor de progesterona; HER2, receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano.

ANEXO 4. Cálculo estadístico entre estadios oncológicos

Variable	Estad	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
PUM1	0	21	50.50	17.60	43.54	15.80	0.0012
PUM1	1	10	110.98	38.33	111.83		
PUM1	2	3	82.06	30.37	83.94		
PUM1	3	3	88.82	49.09	77.13		

Variable	Estad	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
RNasa P	0	21	32.53	11.39	28.89	13.88	0.0031
RNasa P	1	10	75.55	36.65	64.20		
RNasa P	2	3	53.05	33.47	64.39		
RNasa P	3	3	81.58	46.79	95.07		

PUM1

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PUM1	37	0.50	0.45	38.78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	26043.43	3	8681.14	10.98	<0.0001
Estad	26043.43	3	8681.14	10.98	<0.0001
Error	26088.55	33	790.56		
Total	52131.98	36			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=48.52888

Error: 790.5621 gl: 33

Estad	Medias	n	E.E.
0	50.50	21	6.14 A
2	82.06	3	16.23 A B
3	88.82	3	16.23 A B
1	110.98	10	8.89 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

RNasa P

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RNasa P	37	0.43	0.38	51.02

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	15954.37	3	5318.12	8.24	0.0003
Estad	15954.37	3	5318.12	8.24	0.0003
Error	21304.59	33	645.59		
Total	37258.96	36			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=43.85427

Error: 645.5937 gl: 33

Estad	Medias	n	E.E.
0	32.53	21	5.54 A
2	53.05	3	14.67 A B
1	75.55	10	8.03 A B
3	81.58	3	14.67 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)