



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Análisis del perfil mutacional de cáncer de mama no hereditario en mujeres mestizas-mexicanas con peso normal y obesidad mediante un microarreglo de DNA mitocondrial”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA

LBm. Nishi Alan Adams Reyes

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Ileana Patricia Canto Cetina
Facultad de Medicina (UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Elizabeth Langley McCarron
Instituto Nacional de Cancerología

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Facultad de Química (UNAM)
MÉXICO, CDMX. Septiembre, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Es a fuerza de observación y reflexión por el que se
encuentra un camino. Así que tenemos que cavar y
cavar sin cesar.*

-Claude Monet-

Agradecimientos

- ❖ *Agradezco en primer lugar a la Dra. Ileana Patricia Canto Cetina por su apoyo, guía y ánimos durante la realización de este trabajo de investigación.*
- ❖ *Al. Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez por los consejos y sugerencias que fueron de gran ayuda durante este trayecto.*
- ❖ *Gracias Dr. Juan Carlos Zenteno Ruíz por permitirme realizar este proyecto de investigación en su laboratorio.*
- ❖ *Agradezco en gran medida a la Dra. Vanesa Villegas Ruíz que estuvo conmigo paso a paso durante la realización de este proyecto, permitiéndome aprender de toda su experiencia.*
- ❖ *Al comité tutor, Dra. Elizabeth Langley McCarron y al Dr. Marco Antonio Cebón Álvarez que siempre dieron consejos y recomendaciones para este proyecto.*
- ❖ *Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa, al Dr. José de Jesús García Trejo, a la Dra. Martha Menjivar Iraheta, al Dr. Alfonso Dueñas González y al Dr. Samuel Canizales Quinteros por revisar este escrito y realizar las correcciones y comentarios pertinentes.*
- ❖ *Agradezco al Dr. Juan Pablo Méndez, por brindarme la oportunidad de estar en la unidad de investigación y estar al pendiente de este trabajo.*
- ❖ *A mis compañeros de laboratorio que estuvieron ahí apoyándome con sugerencias, comentarios y risas durante este trayecto.*

Este proyecto fue realizado gracias al apoyo parcial otorgado por la División de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (**UNAM**).

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por haberme otorgado una beca durante la realización de esta tesis y durante mis estudios de maestría; dicha beca se encuentra con el número de registro (**378553**).

La presenta tesis se llevó a cabo en la *Unidad de Investigación en Obesidad* de la *Facultad de Medicina* de la *Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)* en conjunto con la *Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP”*

Dedico esta tesis a mi madre y a mi hermano; que día a día estuvieron al pendiente de todos mis pasos; a mi familia que siempre me dio el apoyo incondicional para realizar mis anhelos. A mis amigos que aunque, no entendían de qué hablaba siempre me pusieron su mejor cara de interés.

Al joven Lara le atribuyo parte de esta trabajo, ya que se desveló y me apoyo más de unas cuantas veces mientras hacia este escrito, seguramente no sería lo mismo sin su ayuda y ánimos de continuar.

A mis amigos congéneres que buscamos seguir en la investigación, les dedico parte de este escrito, por entender mis momentos más oscuros y ayudarme a superarlos.

A todos ustedes gracias.

Tabla de contenido

1	<i>Lista de abreviaturas</i>	1
I.	<i>Resumen</i>	4
II.	<i>Antecedentes</i>	5
	A. Obesidad	5
	B. Cáncer y obesidad	7
	C. Cáncer de mama	8
	D. Etiología del Cáncer de mama	9
	E. DNA y proteínas mitocondriales	11
	F. Mecanismos implicados en el cáncer	13
	G. Mitocondria y cáncer	14
	H. Tecnología de microarreglos y cáncer	16
III.	<i>Planteamiento del problema</i>	18
IV.	<i>Justificación</i>	18
V.	<i>Hipótesis</i>	19
VI.	<i>Objetivo General</i>	19
	A. Objetivos particulares	19
VII.	<i>Sujetos</i>	20
	A. Criterios de inclusión	21
	B. Criterios de exclusión	22
	C. Criterios de eliminación	22
	D. Consideraciones Éticas	22
VIII.	<i>Métodos experimentales</i>	23
	A. Extracción de DNA de sangre periférica	23
	B. Extracción de DNA de tejido tumoral mamario	23
	C. Protocolo de microarreglos de DNAMt (Mitochip v2.0)	24
	D. Purificación y elución	25

E. Marcaje	26
F. Hibridación y lavado	27
G. Análisis automatizado de los datos del MitoChip v.2.0	28
IX. Resultados	30
X. Discusión	44
XI. Conclusiones	54
XII. Perspectivas	55
XIII. Referencias	56
XIV. Anexos	65
A. Carta de autorización de la Comisión de Investigación y Ética	65
B. Carta de consentimiento informado	66
C. Carta de revocación del consentimiento informado	70

1 Lista de abreviaturas

Abreviaciones

AR	Artritis reumatoide
ATP	Adenosil trifosfato
ATP6	ATPsintasa subunidad 6
Bcl-2	Del inglés “Bi-cel lymphoma 2”
CaM	Cáncer de mama
CO1	Ciclooxygenasa 1
CR: OH	Origen de la replicación de la cadena pesada
CR:mtTF1	Región de control del factor de transcripción mitocondrial 1
CSB1	Región de control: secuencia conservada del bloque 1
CTE	Cadena transportadora de electrones
CYB	Citocromo B
D-Loop	Asa D mitocondrial
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAmt	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
FUCAM	Instituto de la Fundación del Cáncer de mama
GSEQ v4.0	GeneChip Sequence Analysis Software versión 4.0
HAS	Hipertensión arterial sistémica
HV1	Zona hipervariable 1
IL-1	Interleucina 1

IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de masa corporal
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
Mitochip v2.0	Microarreglo de DNA mitocondrial versión 2
n Call	No llamado de bases
ND1	NADH deshidrogenasa subunidad 1
ND4	NADH deshidrogenasa subunidad 4
ND5	NADH deshidrogenasa subunidad 5
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rCRS	Secuencia consenso de Cambridge revisada
RNAr	Ácido ribonucleico ribosomal
RNA _t	Ácido ribonucleico de transferencia
RNA _t -Ala	RNA de transferencia para alanina
RNA _t -Gly	RNA de transferencia para glicina
ROS	Especies reactivos de oxígeno
TFAM	Factor de transcripción mitocondrial A
TNF α	Factor de Necrosis tumoral alfa
WCRF	Del inglés Fundación Mundial para la Investigación del Cáncer

Aminoácidos

Nombre	Código 3 letras	Código 1 letra
Alanina	ALA	A
Asparagina	ASN	N
Ácido aspártico	ASP	D
Ácido glutámico	GLU	E
Glicina	GLY	G
Leucina	LEU	L
Metionina	MET	M
Fenilalanina	PHE	F
Serina	SER	S
Treonina	THR	T
Tirosina	TYR	Y
Valina	VAL	V

I. Resumen

La obesidad es uno de los problemas de salud más importantes en el mundo y México no es la excepción, siendo la prevalencia de ésta en los adultos en nuestro país del 32.4%, con un mayor predominio en mujeres. La obesidad se ha asociado con distintas entidades patológicas, como son algunos tipos neoplasias, entre las que se encuentra el cáncer de mama (CaM).

El CaM es un problema de salud pública global y actualmente se desconoce la etiología de la enfermedad, sin embargo, se considera como un padecimiento multifactorial, donde la predisposición genética, la función mitocondrial, la exposición a factores de riesgo como la obesidad, entre otros, podrían tener un rol crucial en el desarrollo de esta. Se ha propuesto que la disfunción mitocondrial es uno de los mecanismos por los que la obesidad contribuye al CaM.

Se conoce poco el rol que juega el estrés oxidativo en la carcinogénesis, así como los defectos mitocondriales contribuyen al desarrollo y progresión del cáncer. Se sabe que la mitocondria es fuente importante en la producción de especies reactivas de oxígeno, estas especies pueden afectar al DNA mitocondrial (DNAmt); ya que es especialmente vulnerable al daño oxidativo. Dado que el aumento del estrés oxidativo y la obesidad participan en la etiopatogenia del nos planteamos estudiar y comparar la secuencia del DNAmt de sangre periférica con el del tejido tumoral de mujeres con CaM con normopeso u obesidad por medio de un microarreglo de secuencia, con el fin de analizar la presencia de mutaciones somáticas.

Este es un estudio piloto, en el que observamos que en ambos grupos de mujeres, se encontraron diversas mutaciones tanto en regiones de control como codificantes del DNAmt; sin embargo en el grupo con obesidad se encontraron diversas mutaciones no reportadas previamente; las cuales podrían estar impactando en la función de los diversos complejos proteicos mitocondriales alterando la progresión tumoral.

II. Antecedentes

A. Obesidad

La obesidad se define como una modificación en el consumo y gasto de energía (Devlin, 2009), la cual conlleva a un aumento en el tejido adiposo. La obesidad se puede determinar por una variedad de mediciones antropomórficas, como es la medida de la cintura, así como con el índice cintura cadera y el índice de masa corporal, medida usada convencionalmente (Janssen, Katzmarzyk, and Ross 2004). Además de estas mediciones, el uso de aparatos que determinan el porcentaje de grasa corporal han sido usadas ampliamente (Bernhard et al. 2016). La Organización Mundial de la Salud utiliza el índice de masa corporal (IMC) como método de detección de obesidad a nivel mundial, un IMC de ≥ 30 kg/m² se considera como obesidad; a nivel mundial, la población que presenta algún grado de obesidad ha aumentado, ya que tanto los países primermundistas como en vías de desarrollo son afectados por esta epidemia (figura 1).

La OMS en su último censo estimó que más de la mitad de la población mundial presenta algún grado de sobrepeso u obesidad (OMS, 2014) colocando a este padecimiento como un problema de salud pública a nivel global. En México, la prevalencia de la obesidad sigue el comportamiento a nivel mundial; la encuesta Nacional de Nutrición del 2012 reveló que más del 60% de la población mexicana presenta algún grado de sobrepeso u obesidad, llegando hasta un 73% la población femenina mexicana que presenta un IMC ≥ 25 kg/m². (OMS, 2011; figura 1).

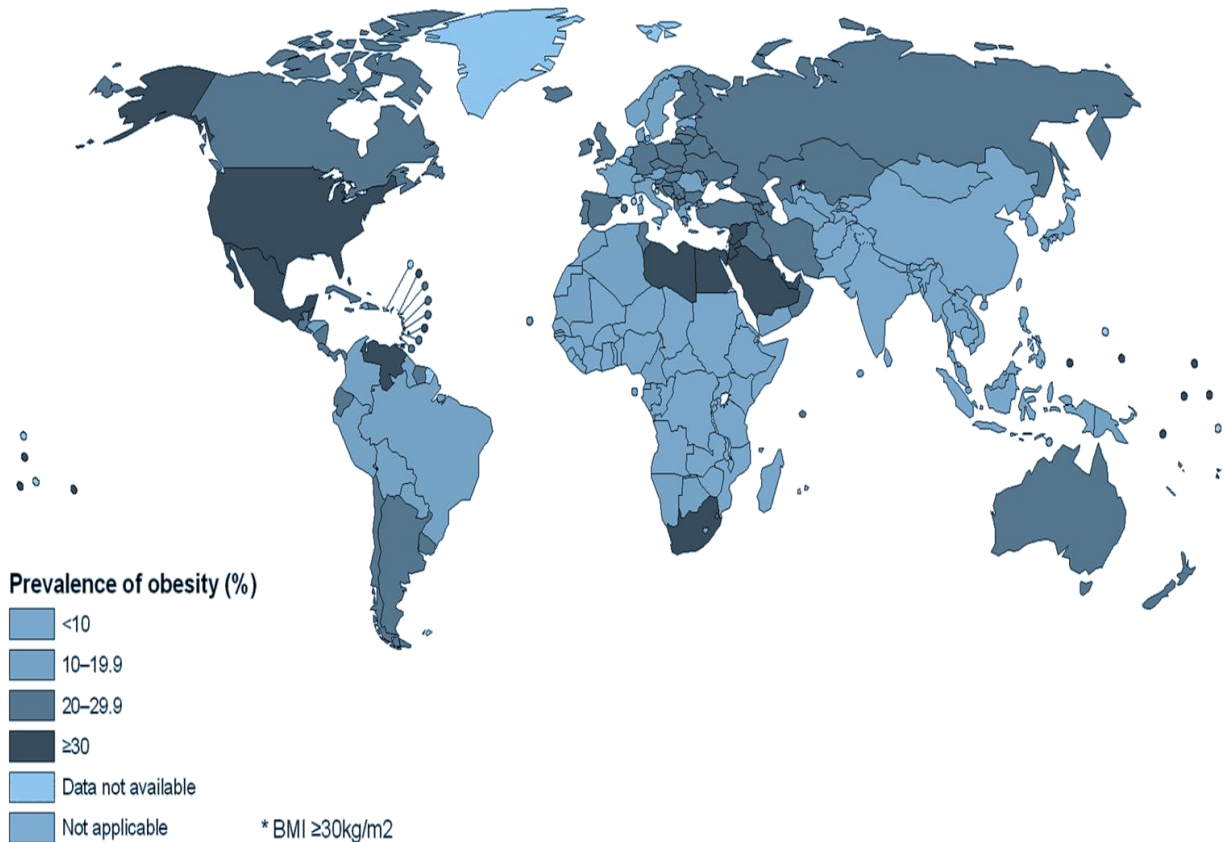


Figura 1. Prevalencia de obesidad a nivel mundial. Porcentaje de la población por país a nivel mundial que presenta un IMC≥30 kg/m². (OMS, 2011)

La obesidad es una enfermedad multicausal, en la cual, la disminución de la actividad física, la mayor disponibilidad de alimentos (Cohen 2008; Wieting 2008), así como la contribución genética y cambios neuroendocrinos que modulan las conductas de apetito y saciedad, contribuyen al establecimiento y mantenimiento de la misma (O’Rahilly and Farooqi 2008; Cohen 2008).

Los estudios epidemiológicos han demostrado que la obesidad se asocia con un mayor riesgo de morbilidad, discapacidad y de mortalidad; asimismo, diversos análisis demuestran que la obesidad se encuentra asociada con un mayor riesgo de

padecer ciertos tipos de enfermedades como son: *diabetes mellitus*, hipertensión, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares y en los últimos años (Guh et al. 2009), se ha visto asociación con la aparición, establecimiento y progresión de diversas neoplasias (Marchesini et al. 2008; Guh et al. 2009; Reisin and Jack 2009). Aunado a lo anterior, estudios recientes catalogan a la obesidad como una enfermedad inflamatoria crónica de bajo impacto, esto debido por la secreción constante de citosinas proinflamatorias (Brown and Simpson 2012; Zorzano et al. 2008; Vucenik and Stains 2012) como: factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) e interleucina 1 y 6 (IL-1, IL-6) que se da en el tejido adiposo blanco a nivel visceral (Shoelson, Herrero, and Naaz 2007). En conjunto, este proceso tiene la capacidad de modificar y/o dañar macromoléculas como son el DNA alterando la función celular (Fernández-Sánchez et al. 2011). Estas modificaciones metabólicas dadas en la obesidad están relacionados con el proceso neoplásico y su progresión (Katiyar and Meeran 2007; Colotta et al. 2009).

B. Cáncer y obesidad

El Fondo de Investigación Mundial del Cáncer ha estimado, desde hace muchos años, que alrededor del 30-40% de todos los cánceres se pueden atribuir a una alimentación inadecuada, a la inactividad física y a la presencia de incremento ponderal (World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997). En relación con aquellos tipos de cánceres en los cuales se ha postulado que la obesidad influye en su morbilidad y/o mortalidad, el cáncer de mama ocupa un lugar preponderante (Brown and Simpson 2012; Zhao et al. 2012; D. Wang et al. 2012; Reddy et al. 2013).

C. **Cáncer de mama**

El cáncer de mama (CaM) es un problema de salud pública mundial, ya que ocupa el segundo lugar de las neoplasias diagnosticadas a nivel global. En la población femenina, el CaM se encuentra en primer lugar, con una incidencia a nivel mundial del 25.1 y 14.7 de mortalidad por cada 100,000 habitantes a nivel mundial (Globocan, 2012; figura 2). De manera semejante a lo observado a nivel mundial, en México CaM también es un problema de salud, la incidencia de esta neoplasia ha ido en aumento en los últimos años, en México la incidencia de esta enfermedad hasta el 2013 llegó a 26.2 por cada 100,000 habitantes, mientras que su mortalidad

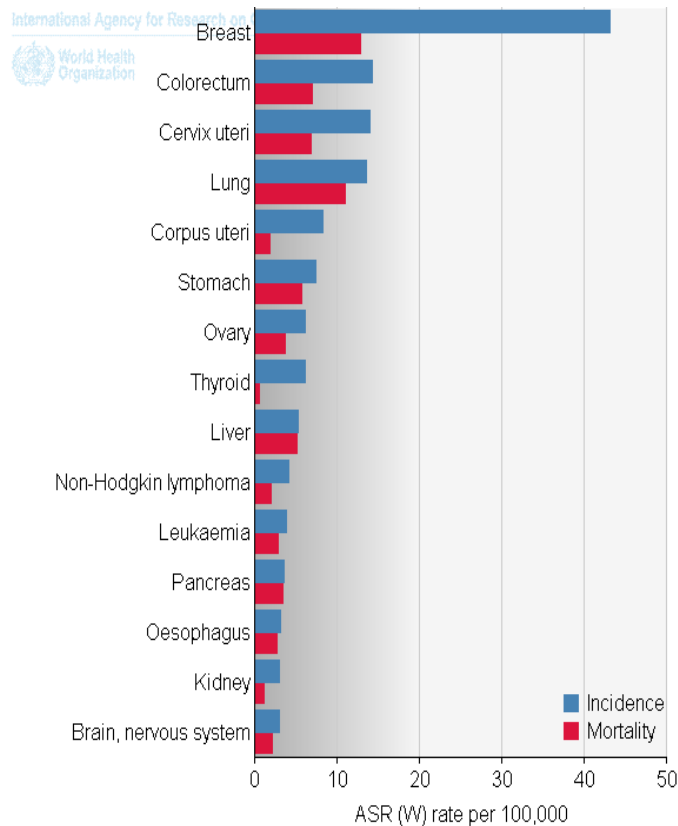


Figura 2. Tipos de cáncer más frecuentes en población femenina a nivel mundial. El CaM a nivel mundial es la primera causa de muerte por cáncer a nivel mundial, la incidencia de CaM de 25.1 mientras que su mortalidad es aproximadamente del 14.7 por cada 100,000 habitantes a nivel mundial. (GLOBOCAN 2012)

observada hasta el 2012 se encontró en una tasa del 14.76 por cada 100,000 habitantes (INEGI, 2013).

D. Etiología del Cáncer de mama

En la actualidad se desconoce la etiología precisa del CaM; sin embargo, se considera como padecimiento multifactorial, donde los efectos medioambientales, la función celular, como la predisposición genética incluyendo cambios genéticos a nivel nuclear y mitocondrial, la exposición a factores de riesgo como la obesidad; se interrelacionan en el desarrollo de la enfermedad (OMS, 2006). Investigaciones sugieren que un factor de riesgo como la obesidad, es un elemento primordial en el momento del diagnóstico de CaM; ya que se asocia a mayor recurrencia y mortalidad en esta patología (Majed et al. 2008). El Fondo Mundial para la investigación del Cáncer (WCRF, 2012) estimó que aproximadamente el 30% de todos los cáncer esporádicos están asociadas con la obesidad, siendo CaM uno de estos.

Los mecanismos por los que la obesidad contribuye al CaM son múltiples. En los últimos años, se ha visto que cambios a nivel proteico y del DNA mitocondrial (DNAMt) están relacionado con el proceso neoplásico (Bai et al. 2007; Grattagliano et al. 2012). Se ha descrito que las personas con obesidad presentan cambios en la morfología mitocondrial y en la homeostasis bioenergética de la cadena transportadora de electrones (CTE) contribuyendo a una disminución del contenido de adenosil trifostado (ATP) (DiMauro and Schon 2003), lo que conlleva a un mayor riesgo de desarrollar complicaciones metabólicas (Grattagliano et al. 2012) Figura 3. La CTE se encuentra en la membrana interna mitocondrial, está permite una serie de reacciones bioquímicas que producen ATP (Taanman 1999); el paso de

electrones a través de diversos complejos proteicos permite un gradiente electroquímico que favorecen la formación de ATP (Hock and Kralli 2009).

Sin embargo, aun cuando el transporte de electrones sea favorable, una pequeña cantidad de estos electrones son obtenidos del oxígeno; por lo que resulta la formación de diversos radicales libres como el superóxido (Fleury, Mignotte, and Vayssière 2002; Mantena et al. 2008; Turrens 2003); estos radicales libres son considerados los principales responsables de la alta tasa mutacional presente en el DNAm. Además de las modificaciones metabólicas, la mitocondria es responsable del proceso apoptótico (Carew et al. 2002), tanto por las vías intrínseca como extrínseca y de proliferación celular por el supresor tumoral p53 y la familia de proteínas Bcl-2 responsables de la permeabilidad de la membrana mitocondrial (X. Wang and Welsh 2014), desencadenando toda la respuesta enzimática de muerte o proliferación celular (Ralph, Rodríguez-Enríquez, Neuzil, and Moreno-Sánchez 2010; Carew et al. 2002).

Se ha descrito que los individuos con obesidad pueden presentar una menor definición de las membranas internas mitocondriales y una reducción en las vías de oxidación de ácidos grasos (Carrer et al. 2012; Sadler et al. 2012). Asimismo, diversos estudios demuestran que la producción crónica de especies reactivas de oxígeno (ROS) a nivel mitocondrial (Turrens 2003), puede provocar la acumulación de lípidos en los tejidos (Mantena et al. 2008); y estos a su vez se relacionan con el proceso de resistencia a la insulina en personas con obesidad (Ma 2012; Tang et al. 2012; Yang et al. 2000). El proceso de estrés oxidativo, la inflamación a nivel sistémico y como se mencionó anteriormente, los defectos en la mitocondria pueden estar relacionados con el origen de procesos patológicos como es la obesidad y el

cáncer (Penta et al. 2001; Nichols et al. 2009; Langelaan et al. 2009; Reddy et al. 2013).

E. DNA y proteínas mitocondriales

La mitocondria tiene su propio DNA, en humanos este DNAm_t se encuentra en forma circular, constituido por 16.6 kb (Cann, Stoneking, and Wilson 1987). Una mitocondria puede tener múltiples copias de esta macromolécula, que puede variar de 2 a 10 copias por organelo (Fernández-Silva, Enriquez, and Montoya 2003).Figura 3.

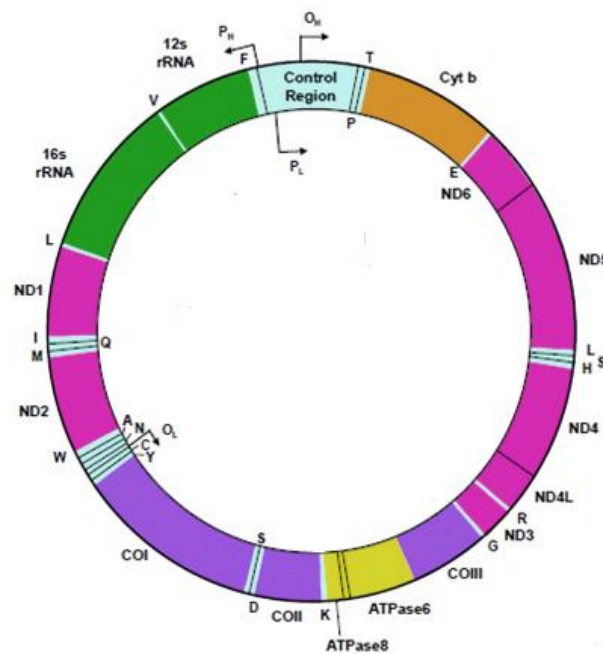


Figura 3. Representación del DNAm_t y localización de los diferentes loci. La molécula de DNAm_t tiene una zona de control donde se encuentran los sitios de origen de la replicación y sitios de inicio de la transcripción conocida como asa D (D-loop), en ambas cadenas (H y L) se presentan los genes codificantes para las diferentes subunidades de los complejos I,

Asimismo, la mitocondria sintetiza una variedad de proteínas que tienen función en la CTE; además de tener sus propios RNA ribosomales y de transferencia (DiMauro and Schon 2003):

- 2 RNAr.
- 22 RNAt.
- 13 subunidades proteicas de los complejos I, III, IV y V de la CTE (figura 4).

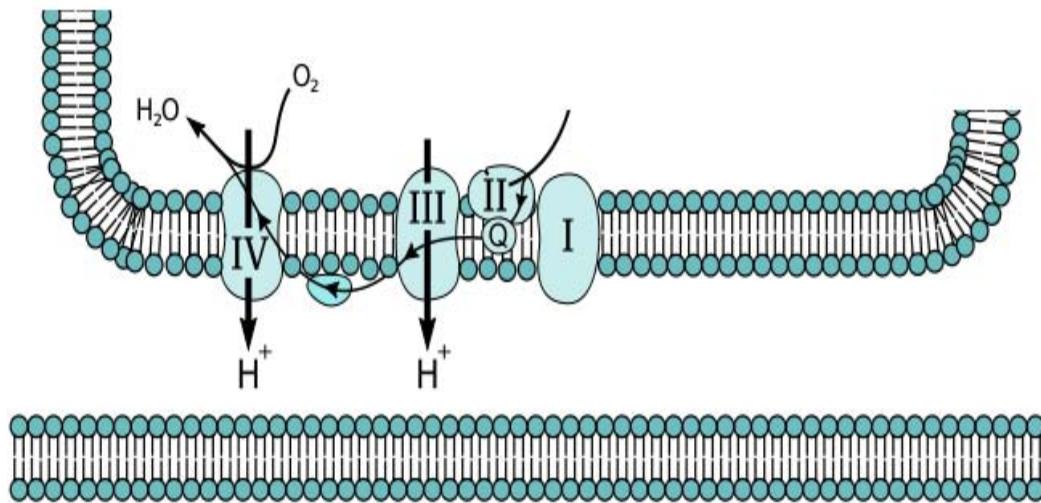


Figura 4. Gráfico de la cadena transportadora de electrones. En la figura 4 se muestra el esquema de los diferentes componentes de la CTE para la generación de ATP; la CTE inicia con una serie de reacciones tipo redox, los cuales utiliza donadores del complejo I (NADH) hasta el aceptor final de electrones, generalmente O_2 . Los complejos enzimáticos I, III y IV al tener función como bombas de protones, permite la generación de un gradiente de protones utilizado por la ATPsintasa para la generación de ATP. En la membrana interna mitocondrial se encuentran los complejos proteicos responsables de la cadena transportadora de electrones (CTE) los cuales son sintetizados en su mayoría por la propia mitocondria excepto por el complejo Q sintetizado e importado desde el citoplasma.

La molécula de DNAm no tiene proteínas de protección tipo histonas, sin embargo, se ha observado que el factor de transcripción TFAM sirve como molécula de protección y empaquetamiento (Sotgia et al. 2012; Alam et al. 2003). A pesar de

esto, el DNAm es susceptible a daño oxidativo (Mantena et al. 2008; Richter, Park, and Ames 1988), además de que este tipo organelo tiene mecanismos de reparación de DNA deficientes comparados con los que se encuentran a nivel nuclear, por lo que el número de mutaciones presentes en el DNAm es mayor comparado con las presentes a nivel nuclear (Penta et al. 2001; Wallace 1999). De igual forma, la disfunción mitocondrial se relaciona con diversos mecanismos adquiridos por células cancerosas durante el proceso de malignización (Hanahan and Weinberg 2011; Floor et al. 2012; Formentini, Martínez-Reyes, and Cuezva 2010; Richard et al. 2000).

F. Mecanismos implicados en el cáncer

El proceso de malignización observado en el cáncer, se caracteriza por células sanas, donde exhiben cambios en su fisiología, morfología, y en los mecanismos de crecimiento y arresto celular (Barcellos-Hoff, Lyden, and Wang 2013), utilizadas para la sobrevivencia y proliferación (Hanahan and Weinberg 2011). Se ha descrito que las células neoplásicas cambian su metabolismo hacia vías glucolíticas; la cual es usada por las células en crecimiento (WARBURG 1956) Los diferentes procesos que ocupa una célula tumoral para su sobrevivencia y llevarse un proceso patológico son los siguientes(Cavallo et al. 2011; Hanahan and Weinberg 2011) Figura 5:

- Pérdida de la adherencia celular y metástasis
- Insensibles a señales de arresto celular
- Señales de crecimiento autocrinas
- Angiogénesis sostenida

- Evasión de señales apoptóticas
- Potencial de replicación ilimitado



Figura 5. Marcadores moleculares de una célula cancerígena. Existen diez marcadores moleculares que permiten la identificación de células con capacidad de provocar el cáncer. 1. Crecimiento incontrolado, 2. capacidad replicativa ilimitada, 3. daño genómico, 4. estrés mitótico, 5. inestabilidad genómica, 6. modificaciones en el balance bioenergética, 7. evasión de las señales inmunes, 8. insensibilidad a señales apoptóticas, 9. Señales de crecimiento autosustentables y 10. Angiogénesis sostenida I. (Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011).

G. Mitocondria y cáncer

Las modificaciones que presentan las mitocondrias y como éstas influyen en proceso carcinogénico han sido estudiadas por medio de diferentes enfoques: bioquímico, modelaje *in silico*, por técnicas de biología molecular y genética. La importancia del análisis del DNAmT en el desarrollo del CaM se basa en la búsqueda de variantes genéticas, en estudio de genética de poblaciones y la investigación de mutaciones somáticas en diversos tipos de cáncer, donde el análisis de estas

mutaciones permitiría el mejor entendimiento de la progresión, mantenimiento del tejido blanco.

Con base en lo anterior, se han realizado estudios de asociación de diversas variantes alélicas con la presencia de CaM y relacionar éstas con una mayor incidencia, recurrencia o mejor pronóstico de la enfermedad (Penta et al. 2001). Uno de los polimorfismos más estudiados en cáncer de mama en diversas poblaciones, es el G10398A del gen mitocondrial ND3 (Czarnecka et al. 2010), ATP6 (Grzybowska-szatkowska et al. 2014). En forma interesante, se ha descrito que aproximadamente el 80% del grupo étnico caucásico poseen el alelo 10398A, mientras que la frecuencia de este alelo en los individuos de origen étnico africano es del 5% (Torrioni and Wallace 1994). En un estudio de asociación llevado a cabo en mujeres con CaM de origen africano-americano se encontró una asociación del alelo 10398A con la susceptibilidad de presentar cáncer de mama invasivo (Canter et al. 2005)

Por otra parte, se ha descrito mutaciones somáticas en diversos tipos de neoplasias (de cabeza y cuello, bazo, próstata entre otros), sugiriendo que la tasa mutacional del DNAm se encuentra elevada dependiendo del tejido analizado (Fliss et al. 2000; Bianchi, Bianchi, and Bailliet 1995; Petros et al. 2005; Tamura et al. 1999).

La mayoría de los estudios enfocados en la búsqueda de mutaciones somáticas, tienen el inconveniente que solo se toman pequeñas porciones del DNAm (Czarnecka et al. 2010; Cheng et al. 2014; Chen et al. 2002). Al analizar regiones pequeñas del DNAm se pierde información de los diferentes complejos

enzimáticos mitocondriales que están participando en la bioquímica celular; Lo cual en el proceso tumoral es de gran importancia.

Diversos grupos se han enfocado en la búsqueda de mutaciones en las regiones no codificantes de la mitocondria en diversos tipos de neoplasia; se han observado mutaciones en el D-Loop en cáncer de ovario, mama, colon, e hígado (Kong, Shi, and Li 2015; Guo et al. 2016; Maggrah et al. 2013; Okochi et al. 2002). Las mutaciones en la región D-Loop a pesar de no tener función codificante, si podría modificar la función del organelo, ya que en esta fracción de DNA se encuentran las regiones de control del procesamiento del DNA.

H. Tecnología de microarreglos y cáncer

La técnica de microarreglos ha facilitado el análisis del genoma, ya que tiene la capacidad de monitorear miles de genes de forma simultánea, permitiendo medir diferentes tipos de hibridación por medio de fluorescencia y comparar las secuencias en condiciones distintas (Maitra et al. 2004). La primera generación de este microchip solo permitía el análisis de la región codificante (Maitra et al. 2004) es decir, no se analizaba el D-Loop ni las regiones de control (Maitra et al. 2004); sin embargo, MitoChip v 2.0 incluye en su set de secuencias, una serie de sondas redundantes que permiten discernir de manera relativamente fácil la región de control del DNAm (Zhou et al. 2006).

El uso de esta tecnología ha permitido el hallazgo de diversas variantes alélicas en diversos tipos de enfermedades. Por medio de una técnica no invasiva se obtuvieron diversos tipos de mutaciones en mujeres con CaM; en pacientes con cáncer de lengua, cáncer gastrointestinal, entre otros (Jakupciak, Maggrah, et al.

2008; Mithani et al. 2009; Sui et al. 2006). Esta técnica de biología molecular puede ser de ayuda en el análisis del genoma completo mitocondrial, en diversos tipos de enfermedades, así como en cáncer (Zamzami et al. 2011).

Esta misma tecnología ha sido usada como método de detección de mutaciones mitocondriales en CaM a través del aspirado del fluido del pezón (Jakupciak, Maggrah, et al. 2008), en este estudio se encontraron diversas mutaciones somáticas y una gran cantidad de polimorfismos. Este grupo demostró que la técnica de microarreglos incorporando la toma de muestra no invasiva, como es el aspirado, permite la detección de mutaciones mitocondriales del tejido ductal.

En nuestro caso esta tecnología nos permitirá el análisis de mujeres con CaM, aunado a dos condiciones de IMC, incluyendo con peso normal y obesidad.

III. Planteamiento del problema

A nivel mundial se ha observado que la prevalencia de la obesidad ha aumentado, México no es la excepción y la prevalencia de este padecimiento se ha visto acrecentada en los últimos años, colocando a nuestro país en segundo lugar a nivel mundial en obesidad. Diversos estudios han propuesto que un índice de masa corporal ≥ 30 kg/m² se relaciona con un mayor riesgo de presentar algún tipo de neoplasia; como es el caso del CaM. De manera semejante, se ha demostrado que tanto en el CaM como en la obesidad, se presentan modificaciones en el DNAmT, que podrían estar afectando la etiopatogenia de ambas enfermedades. Dado lo anterior es necesario un estudio piloto donde se analice el DNAmT de mujeres con CaM y obesidad, el cual servirá como primer acercamiento para determinar si existe una relación entre estos padecimientos.

IV. Justificación

Debido a que la prevalencia e incidencia tanto del CaM como de la obesidad se ha incrementado en México y que la participación de la mitocondria en la etiopatogenia de ambas enfermedades se ha comprobado, la búsqueda de mutaciones en el DNAmT de mujeres con CaM y obesidad podría contribuir a esclarecer parte del mecanismo implicado en estas enfermedades.

V. Hipótesis

Las mujeres mestizas-mexicanas con cáncer de mama no hereditario y obesidad presentan mutaciones somáticas en el DNAMt del tejido tumoral diferentes a las mujeres con cáncer de mama no hereditario y peso normal.

VI. Objetivo General

Conocer la frecuencia y localización de mutaciones mitocondriales en el tejido mamario y sanguíneo de mujeres mestizas-mexicanas diagnosticadas con CaM no hereditario, con peso normal y obesidad mediante un microarreglo de secuenciación de DNAMt completo.

A. Objetivos particulares

1. Analizar la secuencia completa de DNAMt de tejido tumoral mamario de mujeres mestizas-mexicanas con peso normal y obesidad.
2. Analizar la secuencia completa de DNAMt de leucocitos de mujeres mestizas-mexicanas con peso normal y obesidad.
3. Comparar las secuencias de DNAMt de leucocitos y tumores mamaros de las mismas pacientes.
4. Realizar una correlación de las mutaciones somáticas del DNAMt de los tumores, con su estadio y características clínicas.

VII. Sujetos

Todas las mujeres de origen étnico mestizo-mexicanas (dado por al menos tres generaciones de la familia en este país) (Gorodezky et al. 2001) con CaM no hereditario fueron reclutadas del Instituto de Enfermedades de la Mama (FUCAM A.C). Las mujeres que accedieron a participar en el estudio, firmaron una carta de consentimiento informado; posteriormente, se tomó una muestra de sangre periférica y se determinó peso y talla para el cálculo del IMC. Cabe aclarar que el fragmento que se utilizó para el diagnóstico histopatológico de CaM fue utilizado para este diseño experimental; por lo que no fue necesario un procedimiento de extirpación adicional para obtener el tejido neoplásico. Las mujeres fueron divididas en dos grupos:

- Pacientes de peso normal (IMC $18.5 < 24.9$ kg/m²)
- Pacientes con obesidad (IMC > 30 kg/m²)

A todas las participantes se les realizó un cuestionario que incluyó las características demográficas, antecedentes médicos personales y familiares, consumo de alcohol, antecedentes de tabaquismo, terapia de reemplazo hormonal y la edad de la menarquía y la menopausia. El fenotipo del tumor se determinó mediante el examen del patrón en el estudio de inmunohistoquímica de las células cancerosas (estudio realizado rutinariamente).

Asimismo, a cada una de las pacientes se le determinó los siguientes factores pronósticos:

1. Edad de la paciente.
2. Tamaño del tumor: TX (no se puede valorar la presencia de tumor primario), T0 (no hay evidencia de tumor primario), T1 (tumor pequeño), T2, T3 (tumor de tamaño mediano), T4 (tumor grande).
3. Estado ganglionar (+ o -): NX (no se pueden valorar nódulos linfáticos regionales), N0 (no hay implicación de nódulos linfáticos regionales), N1, N2, N3 (implicación en incremento de nódulos linfáticos regionales).
4. Grado histológico: GX no es posible asignar un grado (Grado indeterminado), G1 bien diferenciado (Grado bajo), G2 moderadamente diferenciado (Grado intermedio), G3 Mal diferenciado (Grado alto) y G4 Indiferenciado (Grado alto).
5. Panel inmunohistoquímico: Estado del receptor-2 del factor de crecimiento epidermal humano (HER2/neu positivo o negativo); Estado de receptores hormonales (Receptor de Estrógenos y Receptor de Progesterona positivo o negativo), así como del factor de proliferación Ki67.

A. Criterios de inclusión

- Diagnostico histopatológico de CaM operable en mujeres posmenopáusicas.
- Tratamiento inicial sea quirúrgico en alguna de las etapas clínicas (0, I, IIa; IIb).
- Aceptar formar parte del estudio y hayan firmado la carta de consentimiento informado.

B. Criterios de exclusión

- Cáncer de mama localmente avanzado en alguna etapa clínica (IIIa, IIIb, IIIc) o que presenté metástasis (IV).
- Tratamiento previo a la obtención de la muestra, ya sea, por quimioterapia o tratamiento hormonal.
- Antecedentes de neoplasias previas.
- Presenta algún tipo de enfermedad mitocondrial.
- Exhibe un proceso patológico donde la obesidad se encuentra como enfermedad secundaria (Síndrome de Prader-Willi, Lawrence Moon, Cushing, etc.).

C. Criterios de eliminación

- Desean retirar su muestra del estudio.
- No se pueda realizar el estudio comparativo de DNAmT del tejido neoplásico y los leucocitos.

D. Consideraciones Éticas

Este estudio fue aprobado por las Comisiones de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de México con el número de aprobación 115/2013; así como, por el Instituto de Enfermedades de la Mama (FUCAM A.C).

VIII. Métodos experimentales

A. Extracción de DNA de sangre periférica

Se depositó 100 µl de sangre periférica en un microtubo de 1.5 mL, se le agregó 20 µl de proteinasa K, se llevó a un volumen de 220 µl con PBS 1X y la reacción se incubó por 10 minutos a 56°C. Posteriormente, se llevó continuó con el mismo procedimiento descrito en el apartado de extracción de DNA de tejido tumoral (*DNeasy Blood & Tissue kit, Proveedor México*). Al término del protocolo de extracción de DNA de sangre periférica se determinó la pureza y la concentración del DNA con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. Las muestras fueron almacenadas a -20° C hasta su uso.

B. Extracción de DNA de tejido tumoral mamario

Se usó un estuche comercial de la casa QIAgen (*DNeasy Blood & Tissue kit, Proveedor México*): se tomó un fragmento de tejido de ~25 mg y se colocó en un microtubo de 1.5 mL, se procedió a homogenizar el tejido con amortiguador de lisis ATL y se procedió a homogenizar utilizando el **Tissue Rupter**; una vez obtenidos fragmentos pequeños del mismo, al microtubo se le agregó proteinasa K y se incubó a 56°C hasta la completa lisis del tejido. Al finalizar la incubación, se agregó amortiguador AL y etanol al 96%; posteriormente se transfirió esta mezcla en una columna de recolección y se dejó incubar en dicha columna durante 5 minutos; al termino de ese tiempo se procedió a realizar una centrifugación a 8000 rpm por un minuto, se desechó el líquido filtrado, se agregó a la columna el amortiguador AW1

y se realizó una nueva centrifugación a 8000 rpm durante 1 minuto. Se procedió a desechar nuevamente el filtrado, se agregó el amortiguador AW2 y se centrifugó a 14000 rpm por 1 minuto. Finalmente, a la columna se agregó el amortiguador de elución AE, se dio un tiempo de incubación de 1 minuto, se centrifugó a 8000 rpm. Una vez obtenido el DNA eludido y limpio se determinó la concentración y sus relaciones 260/280 y 260/230 en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, al finalizar se almacenaron las muestras a -20 °C hasta su uso.

C. Protocolo de microarreglos de DNAMt (Mitochip v2.0)

La reacción de resecuenciación del DNAMt se llevó a cabo por superposición de 25-mers en matrices de oligonucleótidos de alta densidad. La amplificación de los fragmentos de DNA se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tres reacciones superpuestas, utilizando 25 ng de DNA genómico. La reacción de PCR se efectuó por el siguiente protocolo: H₂O 7.9 µl, amortiguador PCR 10X 2.5 µl, MgCl 2.5 µl, dNTP's (2.5 mM) 4.0 µl, Primer Forward 1.5 µl, Primer Reverse 1.5 µl, y TaKaRa La Taq 0.1 µl (TaKaRa Mirus Bio. Madison, Wi) para un volumen final de 25 µl por reacción (Affymetrix Inc. 2005).

Los tres pares de oligonucleótidos utilizados para este protocolo de PCR fueron prediseñados por Affymetrix de tamaños diferentes, los cuales amplifican la totalidad del DNAMt:

Mito 1 (3968 pb)

- F: ACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGTCCC
- R: TGAGATTGTTTGGGCTACTGCTCGCAGTGC

Mito 2 (5513 pb)

- F: TACTCAATCCTCTGATCAGGGTGAGCATCAAACCTC
- R: GCTTGGATTAAGGCGACAGCGATTTCTAGGATAGT

Mito 3 (7814 pb)

- F: TCATTTTTATTGCCACAACCTCCTCGGACTC
- R: CGTGATGTCTTATTTAAGGGGAACGTGTGGGCTAT

Las condiciones de termociclado para la reacción de PCR utilizadas fueron: Precalentado 94 °C, desnaturalización de las muestras a 94 °C por 2 minutos, alineación y extensión por treinta ciclos de 94 °C por 15 segundos seguido de 68 °C por 7 minutos y extensión final de 68 °C por 12 minutos. Al término del protocolo de termociclado se verificaron los amplicones con un protocolo de electroforesis usando un gel de agarosa al 1% teñido como bromuro de etídeo, empleando amortiguador TBE, se colocó 4 µl de reacción y se corrió a 80 Vm por 1 hora.

D. Purificación y elución

Los amplicones fueron transferidos a tubos de 1.5 mL y se agregó 12 µl de EDTA 0.5 M seguida de una incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos; después de este tiempo, a cada tubo se le agregó 200 µL de acetato de amonio (7.5 M) e isopropanol 700 µL, se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se procedió a centrifugar a 2,250 RCF (g) por 30 minutos a 4 °C. Después de la centrifugación se descartó el sobrenadante por decantación y se adicionó 1.4 mL de etanol al 75%, se centrifugó nuevamente a 2,250 RCF (g) por 5 minutos a 4 °C; este procedimiento se realizó dos veces. Para la elución del amplicon limpio se adiciona 45 µl de amortiguador de elución (Qiagen, EB) y se colocó en un

termoblock a 25 °C a 500 rpm por 30 minutos; por último se cuantifico el producto de PCR limpio.

Una vez obtenido el producto limpio, por medio de una hoja de Excel programa por Affymetrix se realizó la cuantificación. En dicho programa se agregó el tamaño de los amplicones y las absorbancias 260 obtenidas del espectrofotómetro de cada producto limpio; de esta manera Excel nos permitió saber las concentraciones de nuestros productos y la cantidad de cada uno necesaria para realizar una mezcla equimolar y la posterior fragmentación. La reacción de fragmentación se realizó tomando 280 ng de la mezcla de los fragmentos, agregando 1.9 µl de amortiguador de fragmentación 10X (Affymetrix Fragmentation Kit, CA) y llevando a un volumen de 17.8 µl con amortiguador RB. El reactivo de fragmentación (con actividad enzimática, 2.5 U/µl) se agregó para llevar a un volumen total de 19.1, finalmente se colocó en un termociclador con el siguiente protocolo: Precaentado a 37 °C, 37 °C por 35 minutos, 95 °C por 15 minutos y 4 °C para mantenimiento.

E. Marcaje

Una vez fragmentados los productos de PCR se siguió con el protocolo de marcado, mezclando Amortiguador de deoxynucleotidil transferasa terminal 5X (5X Tdt amortiguador) 5.7 µl, Reactivo de marcaje de DNA 0.9 µl y Deoxynucleotidil transferasa terminal (Tdt) 1.6 µl (GeneChip Resequencing Assay Kit; Affymetrix, CA); volumen final de 8.2 µl incluyendo 5% extra. De este mix de marcado se agregó a la muestra ya fragmentada 7.8 µl dando un volumen total de 26.9 µl. Este se colocó

en el termociclador con el siguiente protocolo: 37 °C por 2 horas, 95 °C por 15 min y 4 °C para mantenimiento.

F. Hibridación y lavado

Previo a la hibridación se colocó el microarreglo a temperatura ambiente para permitir una buena reacción de hibridación de las sondas. A las muestras marcadas anteriormente se agregó una mezcla de hibridación de TMAC (5 M) 62.4 µl, Tris (1 M, pH: 7.8) 1 µl, Tween-20 (1%) 1 µl, BSA (50 mg/mL) 1 µl, HS DNA (10 mg/mL) 1 µl, Reactivo de oligo control (130X) 0.8 µl y H₂O 8.3 µl. A la muestra marcada se le adicionó 72.0 µl del mix dando un volumen final de 98.9 µl; la desnaturalización de las muestras previo a introducirlas en el arreglo se llevó acabo colocando los tubos en un termociclador a 95 °C por 5 minutos, seguido de 49 °C por 5 minutos. Se colocaron 80 µl en el microarreglo y se procedió a realizar en un Horno de hibridación durante 16 horas a 49 °C a 60 RPM en el horno de hibridación (GeneChip hybridization Oven 650).

Posterior al tiempo de hibridación se removió el coctel de hibridación del chip para llevar acabo el protocolo de lavado. Previo a dicho protocolo se realizaron las soluciones de lavado, así como de anticuerpo y de mantenimiento del microarreglo.

La solución A de lavado no astringente (SSPE 2X, Tween 20 al 0.01%) y solución B de lavado astringente (SSPE 0.6X, Tween 0.06%) ambos en un volumen de 1000 mL, se filtraron utilizando un filtro de 0.2 µm y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso. La solución de mantenimiento.

La solución de tñido se realizó con (H₂O 666.7 µl, SSPE 20X 300 µl, Tween 20 (3%) 3.3 µl, Denharts Sperm (50X) 20 µl para un volumen final de 990 µl; esta

solución de dividió en dos tubos de 1.5 μ l para obtener la solución SAPE (Solución de teñido 495 μ l y Estreptavidina 1mg/ μ l usando 5 μ l) para un volumen final de 500 μ l y la solución del anticuerpo (Solución de teñido 495 μ l y anticuerpo biotinalizado 0.5 mg/ μ l usando 5 μ l) para un volumen final de 500 μ l. Por último la solución de mantenimiento para un microarreglo ([Final 1X] Mes 100 mM, [Na+] 1M. Tween 20 usando 0.01%) para un volumen de 100 mL.

El programa utilizado para la estación de lavado (Affymetrix Fluid Station 450) fue: **Mini_DNAArray_WS5_450_FELXMini_DNAArray_WS5_450**; al termino del ciclo de lavado se colocó el microarreglo en el escáner (Affymetrix GeneChip Scan 3000).

G. Análisis automatizado de los datos del MitoChip v.2.0

El análisis de los datos del microarreglo para los MitoChips v2.0, se llevó a cabo usando “GeneChip Sequence Analysis Software” (GSEQ) v4.0 (Notes, n.d.) utiliza un marco de estadística con base en el algoritmo de ABACUS (Cutler et al. 2001) para asignar a cada posición la base que cumple con los criterios de calidad en el genoma mitocondrial.

Este procedimiento ha sido aplicado con éxito para detección de alto rendimiento de variaciones en humanos, así como para la detección de variaciones en la secuencia mitocondrial en embriones humanos, células madre y diversos tipos de cáncer (Maitra et al. 2004; Zhou et al. 2006). El software GSEQ se usó de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El umbral de calidad se estableció en “3” con el objeto de maximizar el porcentaje de bases asignadas y la fidelidad. De manera semejante se modificó el valor del modelo genómico a “0” para poder

detectar heterocigotos, en el caso del microarreglo de mitocondria para la detección de heteroplasmas; siendo “1” el valor dado por el programa para el modelo genómico para detección de homocigotos.

Para determinar la calidad de los microarreglos obtenidos se usó el valor denominado “Call Rate”; ya que representa el porcentaje de bases hibridadas durante el procedimiento, donde un valor mayor al 75% se considera como bueno.

El diseño de este protocolo experimental permitió el análisis pareado de las muestras de sangre y de tejido tumoral, de esta manera, el propio paciente es su control en el análisis del perfil mutacional.

IX. Resultados

Se ingresaron al estudio previa firma de consentimiento informado 6 mujeres con diagnóstico de CaM; todas ellas fueron reclutadas del Instituto de Enfermedades de la Mama y cumplieron con todos los criterios de inclusión anteriormente mencionados.

De las 6 mujeres con CaM, se dividieron en dos grupos experimentales dependiendo de su un índice de masa corporal (IMC), 3 con IMC normal y 3 un IMC que correspondía a obesidad grado 1 ($\geq 30 \text{ kg/m}^2$).

En tabla 1 se muestran las características generales de las mujeres con CaM.

	#	Edad	Peso	IMC	Co-morbilidad	T	N	M	EC	Estirpe	Grado tumoral	pT	pN	pM	EP	RE %	RP %	Her2/Neu	Ki 67 %
Normal	1	45	46	23.11	NO	2	0	0	IIA	Ductal infiltrante	II	2	1	0	IIB	60	40	-	3
	2	59	63	20.72	DM TX.INSULINA	2	0	0	IIA	Ductal infiltrante gII/Ductal	II	2	1	0	IIB	80	3	-	8
	3	82	44	20.1	AR	3	0	0	IIB	Ductal infiltrante variedad r	II	1	0	0	IA	70	40	-	10
Obesas	4	51	70	31.53	HAS	1	1	0	IIA	Ductal infiltrante	II	2	0	0	IIA	90	2	+	75
	5	59	86	32.8	DM/HAS	2	0	0	IIA	Ductal infiltrante	III	2	1	0	IIB	80	40	-	10
	6	68	68	32.3	DM/HAS	2	0	0	IIA	Mucinoso infiltrante	II	2	0	0	IIA	90	60	-	3

Tabla 1. Características generales de pacientes con cáncer de mama no hereditario. En la tabla se muestra las características clínicas de las pacientes con cáncer de mama no hereditario. IMC: *Índice de masa corporal*; DM: *Diabetes Mellitus*; HAS: *Hipertensión arterial sistémica*; AR: *Artritis reumatoide*, *escala TNM clínica y patológica*, *Marcadores hormonales y Her2*, *marcador de proliferación celular Ki67*.

Asimismo, se obtuvo tanto el DNA de sangre periférica como del tejido tumoral; a todas las muestras de DNA se evaluó integridad, concentración y pureza del mismo.

En la tabla 2 se presentan los valores de la concentración y la pureza de las muestras de DNA de ambos tejidos. Se puede observar que las concentraciones obtenidas son suficientes para el protocolo de micro arreglo y en relación a la pureza del DNA, la relación 260/280 fue adecuada, es decir dentro de los rangos óptimos (1.8 - 2.0).

	Muestras	[ng/μl]	260/280	260/230		Muestras	[ng/μl]	260/280	260/230
Tejido mamario	1	20.9	1.87	1.85	Tejido sanguíneo	1	17.3	1.82	0.70
	2	69	1.89	1.28		2	83.8	1.90	2.46
	3	23	1.79	0.52		3	88.9	1.91	2.50
	4	15.6	2.09	0.56		4	81.6	1.89	2.44
	5	202	1.97	1.78		5	91	1.88	2.47
	6	48.1	1.82	1.01		6	73.9	1.91	3.52

Tabla 2. Concentraciones y relaciones de pureza de muestras de DNA. En las columnas se observan los nanogramos obtenidos en tejido mamario y sanguíneo por medio de kit; las relaciones 260/280 se encuentran en los valores óptimos para el protocolo, sin embargo, la relación 260/230 muestra variaciones que podrían haber afectado el protocolo de PCR.

Asimismo, se tomaron en cuenta las relaciones de absorbancia 260/230 para este protocolo, indicando que las muestras de DNA obtenidas de ambos tejidos tenían un alto grado de pureza. Para verificar la alta calidad del DNA obtenido realizamos un gel de integridad en agarosa al 1% (figura 6).

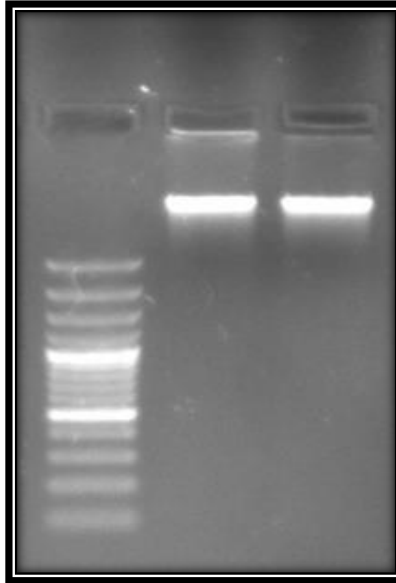


Figura 6. Gel de integridad de DNA. La imagen muestra un ejemplo de DNA extraído de tejido sanguíneo después de la estandarización del protocolo. Es un gel de agarosa al 1% teñido con Midori green; en el primer carril se observa el marcador de peso molecular; mientras que las muestras se presentan en el carril 2 y 3, se observan las bandas características de DNA integro sin presencia de barrido.

De esta manera se obtuvieron los 3 amplicones necesarios para la hibridación con el chip de DNAMt, de todas las muestras a evaluar (Figura 7).

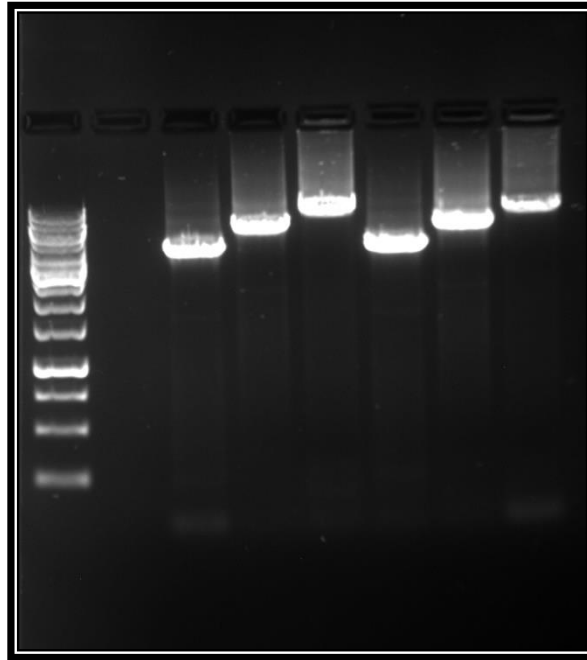


Figura 7. Gel de amplificados de PCR. En la imagen se observan de los carriles 3 al 8 los diferentes amplicones, se muestran las bandas de tamaño e intensidad óptimos para su uso en el resto del protocolo. (Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio)

El sistema automatizado dado por Affymetrix permite la rápida visualización de los SNP's (Figura 8), por medio de la interface virtual; se puede encontrar de manera rápida la sonda usada para determinada posición dentro de la secuencia de DNAMt y ser analizada a partir de la secuencia revisada de referencia de Cambridge (rCRS)(MITOMAP 2012), dicha secuencia consenso deriva de la primera secuencia propuesta por Anderson (Anderson et al. 1981). Además de esto, la tecnología aplicada por Affymetrix para lograr la secuenciación de todo el genoma mitocondrial es por medio de la técnica de **Tiling** la cual funciona usando pequeñas sondas de

25 nucleótidos, donde el nucleótido con posición 13 puede tener una de las 4 bases del DNA (A, C; G, T) de esta manera el traslape de estas sondas permite conocer la secuencia completa de una secuencia de DNA.

Fragment-Pos	Reference	1Blood 1_(Mitoch)	1Tissue 1_(Mitoch)	1Blood 2_(Mitoch)	1Tissue 2_(Mitoch)	1Blood 3_(Mitoch)	1Tissue 3_(Mitoch)	1Blood 4_(Mitoch)	1Tissue 4_(Mitoch)	1Blood 5_(Mitoch)	1Tissue 5_(Mitoch)	1Blood 6_(Mitoch)	1Tissue 6_(Mitoch)
56 human_mtDNA_RCRS-7026	c	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
57 human_mtDNA_RCRS-7027	c	c	n	c	n	c	n	c	y	c	n	c	n
58 human_mtDNA_RCRS-7121	a	a	a	a	a	a	a	a	a	r	r	a	a
59 human_mtDNA_RCRS-7122	a	a	a	a	a	a	a	a	a	g	g	a	a
60 human_mtDNA_RCRS-7123	a	a	a	a	a	a	a	a	r	r	a	a	
61 human_mtDNA_RCRS-7239	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	g	g
62 human_mtDNA_RCRS-7370	t	t	t	t	t	y	t	t	t	t	t	t	t
63 human_mtDNA_RCRS-8025	g	g	a	a	a	a	a	g	g	a	a	g	g
64 human_mtDNA_RCRS-8026	c	c	m	n	n	n	n	c	c	n	n	c	c
65 human_mtDNA_RCRS-8605	c	c	n	c	n	m	c	c	c	c	n	c	c
66 human_mtDNA_RCRS-8792	c	c	t	t	t	t	t	c	c	t	t	c	c
67 human_mtDNA_RCRS-8794	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	y	c	c
68 human_mtDNA_RCRS-8858	a	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
69 human_mtDNA_RCRS-9179	a	a	g	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

Figura 8. Imagen representativa de los resultados obtenidos posterior al análisis automatizado del GSEQ 4.1. La ventana de visualización de SNP's (SNP viewer) permite el análisis de forma rápida y eficiente de cada sonda dentro de los microarreglos. En color **gris** se muestran las bases con respecto a la secuencia consenso (rCRS) de los diferentes tejidos, en **verde** se observan las bases donde hubo un cambio del tipo homoplasmia, en **naranja** se observan cambios heteroplásmicos; mientras que en **azul** se muestran las posiciones de bases donde no hubo el llamado de bases (**n-call**).

Como se refirió en el apartado de la métodos, para este protocolo de microarreglos, los valores del programa GSEQ 4.1 fueron modificados disminuyendo la exactitud del llamado de bases y cambiando el formato homocigoto por heterocigoto; este cambio en los parámetros disminuyo la cantidad de bases no llamadas (n-calls) presentes en el microarreglo de DNAm (MitoChip v2.0), sin embargo, también aumento la cantidad de bases que presentan heteroplasmas.

Los resultados obtenidos de este programa fueron comparados con las bases de datos MITOMAP (<http://mitomap.org>) y la base de datos dada por la Universidad de Uppsala, Suecia (<http://www.mtdb.igp.uu.se>). Algunas variantes que se obtuvieron por el programa GSEQ 4.1 se encontraron en genes no codificantes de RNA de transferencia, en este caso se ocupa la base de datos (<http://mamit-trna.u-strasbg.fr>) para su análisis.

Call Rate %				
IMC	Paciente	Bases	Sangre	Tumor
Normal	1	16544	94.5	94.8
	2		95.6	95.8
	3		95.2	96.1
Obesidad	4		95.9	95.9
	5		94.1	94
	6		95.7	96.5

Tabla 3. Porcentaje de sondas hibridadas (Call Rate) obtenido del programa GSEQ 4.1. En la tabla se puede observar a los dos grupos divididos por su IMC; se muestra el total de bases que se encuentran en el microarreglo de DNAm codificante que se puede hibridar, así como, el porcentaje de bases hibridadas tanto del tejido sanguíneo como tumoral.

En relación a las variantes genéticas, éstas se presentaron tanto en las mujeres con CaM e IMC normal como en las mujeres con CaM e IMC con obesidad. Como se mencionó anteriormente como medida de calidad y confianza de los datos obtenidos se tomó en cuenta el porcentaje de Call Rate tanto de nuestro control interno, que en este caso es el tejido sanguíneo y de nuestro caso, el cual es el tejido tumoral mamario.

La paciente número uno del grupo de IMC normal presentó un Call Rate de 94.5% y del 94.8% para los microarreglos de tejido sanguíneo y tumoral respectivamente en las bases de la fracción codificante. En esta paciente se encontraron tres polimorfismos de acuerdo a la base de datos del genoma mitocondrial (<http://mitomap.org>): uno en la secuencia que codifica para la subunidad 6 de ATPsintasa (ATP6), otro en la secuencia que codifica para el gen citocromo B (CYB) (tabla 4) y el tercero localizado en el RNA de transferencia para glicina (RNAt-Gly) (<http://mamit-trna.u-strasbg.fr>): (Figura 9, Tabla 4).

En forma importante también se encontraron diversas mutaciones somáticas en el tejido tumoral mamario de acuerdo a la base de datos del genoma mitocondrial (<http://mitomap.org>): una situada en la posición 13934 de la secuencia que codifica para la proteína para la subunidad 5 de NADH deshidrogenasa (ND5), dicha mutación cambia el aminoácido tirosina por metionina. Asimismo, en la región no codificante se encontraron diversas mutaciones somáticas en el tejido tumoral mamario; dos de estas mutaciones se encontraron en la región de control 16081 A>C, 16207 A>T (Tabla 4); en esta paciente se encontraron diversos polimorfismos

en la región de control en las posiciones 16278 T>C, 16294 T>C, 16302 A>C, 16316 A>T y 16317 A>C.

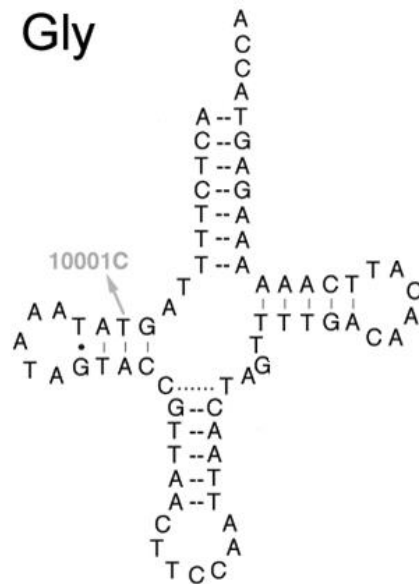


Figura 9. tRNA mitocondrial para Glicina. En la posición 10001 T>C de la paciente 1 se encontró un polimorfismo en el gen para el RNA de transferencia para el aminoácido de glicina; siendo un polimorfismo común en varias poblaciones.

En relación a la paciente número dos, se obtuvo un Call Rate para los microarreglos de tejido sanguíneo y tumoral del 95.6% y 95.8% respectivamente, después del análisis computacional, con estos resultados se encontraron de acuerdo a la base de datos del genoma mitocondrial (<http://www.mitomap.org>), un polimorfismo y una mutación germinal silente: uno en la secuencia que codifica para el gen de la subunidad 1 de NADH deshidrogenasa (ND1) y el otro en el gen que codifica para ciclooxygenasa 1 (CO1), respectivamente (Tabla 4).

El análisis de la paciente tres del grupo con IMC normal, demostró que el Call Rate fue de 95.2% para el microarreglo de tejido sanguíneo y 96.1% para el de tejido tumoral. En estos microarreglos se encontraron diversos cambios: una en HV1 en la posición 16302, se pudo observar que este cambio se presenta como una heteroplasmia A/C en el tejido tumoral sanguíneo como mamario. Referimos que es una heteroplasmia dado que estos cambios se obtuvieron del análisis de las sondas redundantes con las cuales cuenta el microarreglo para HV1; de esta manera la sonda mt104ref16250-1633 registró además de adenina, una citosina en el DNA de leucocitos; mientras que en el tejido tumoral, la sonda mt83ref16199-16335 registró una heteroplasmia en el tejido tumoral en la misma posición. Además en esta misma paciente se localizó la heteroplasmia T/A en la posición 1467 de la secuencia que codifica para el RNA para la subunidad 12S ribosomal (RNR1); así como un polimorfismo en la posición 16270 C>T en ambos tejidos analizados (Tabla 4).

En forma adicional, también se observó en HV1 en la posición 16302, una heteroplasmia A/C en el tejido tumoral, por medio del análisis de las sondas redundantes, y una mutación somática en 16312 A>C en esta paciente.

Con respecto a los resultados del grupo de mujeres con CaM y obesidad, encontramos diversos cambios en su DNAm. La paciente número **cuatro** presentó un porcentaje de Call Rate del 94.1 y 95.9 por ciento para los tejidos sanguíneos y tumoral, respectivamente. En estos microarreglos se encontraron 2 polimorfismos sinónimos ya descritos (<http://www.mtdb.igp.uu.se>); uno de ellos en la secuencia que codifica para el gen Ciclooxygenasa 1 (CO1) y el otro en la subunidad 3 de NADH deshidrogenasa (ND3). Adicional a lo anterior, esta misma paciente presentó

una variante en el gen para citocromo B (CYB) que no se ha reportado en la base de datos utilizada para este trabajo (<http://mitomap.org>); esta mutación se encontró en la posición dos del codón codificante para tirosina en ambos tejidos, siendo una posible mutación germinal, esta transversión sustituyó el codón de tirosina por un codón de fenilalanina (CYB 15781 C>T) (Tabla 4). Asimismo, también se encontró en la región de control una mutación germinal que corresponde al origen de la replicación para la cadena pesa; finalmente, también se observó una mutación somática en HV1 en la posición 16280 A>C (Tabla 4).

La paciente número 5 tuvo un Call Rate de 95.7% y 94%, en estos microarreglos se encontraron diversos polimorfismos y mutaciones tanto en las regiones codificantes como no codificantes (Tabla 4). Se observó un polimorfismo sinónimo en el gen CO1. Con respecto a las mutaciones, se encontró una germinal en la subunidad 4 de NADH deshidrogenasa (ND4), que corresponde a un cambio de serina por asparagina, que no se encuentra reportada en la base de datos (<http://www.mitomap.org>). También se localizaron dos mutaciones en el gen para ND2, ambos no reportados previamente; 5040 A>C, en forma interesante éstas se observaron en el tejido sanguíneo, por lo que se puede tratar de una heteroplasmia; en este mismo gen se halló una mutación germinal, la cual sustituye una metionina por una valina (Tabla 4).

Asimismo, se encontró en el gen codificante para la subunidad ND4, una mutación somática (un cambio de una alanina por una treonina); así como una mutación somática en el gen que codifica para el RNA de transferencia de alanina (RNA^t-Ala) (<http://mamit-trna.u-strasbg.fr>) (Figura 10). Finalmente, en esta misma paciente se observó en la región de control un polimorfismo y dos mutaciones somáticas en el sitio caliente posición 16316 A>T y 16305 A>C (Tabla 4).

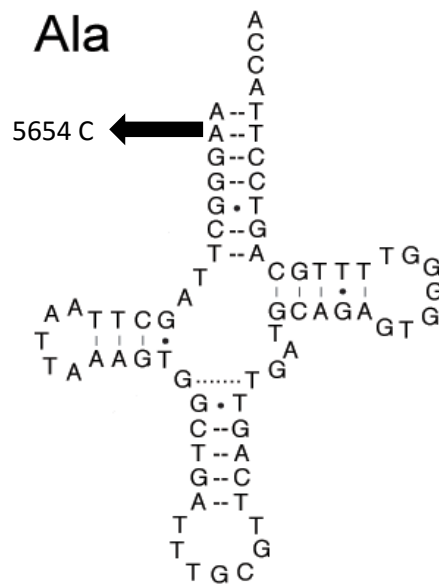


Figura 10. tRNA mitocondrial para Alanina. EN la posición 5654 del gen para RNA de transferencia de alanina se encontró una mutación en el tejido tumoral mamario. Esta mutación no se encuentra reportada en la base de datos para RNAs de transferencia mitocondriales (mamit-trna.u-strasbg.fr).

La última paciente de este grupo con obesidad, presentó los Call Rate de 95.7% y 96.5%, en estos microarreglos se localizaron dos cambios en el gen CO1, un polimorfismo y una mutación germinal; esta última no se ha reportado en la base de datos MITOMAP (<http://www.mitomap.org>) (Tabla 4). Además de estos cambios,

se encontraron tres mutaciones en HV1 en las posiciones 183 G>A que se encuentra en (CR: OH), 246 T>G (CR:mtTF1) y en 16204 G>C.

En resumen, la región del DNAm_t en donde se observaron más del 50% de las variantes genéticas, ya sea polimorfismos como mutaciones somáticas y no somáticas se localizaron en la región D-Loop, un 40% de las variantes se encontraron en diversos loci de la molécula de DNAm_t y alrededor del 7% de las variantes se hallaron en regiones no codificantes del DNAm_t (gráfico 1).

IMC	Paciente	Posición	Cambio	Loci	Aminoacido
NORMAL	1	9181 A>G	Polimorfismo	ATP6	SER>GLY
		10001 T>C	Polimorfismo	MT-TG	
		13934 C>T*	Mutación	ND5	TYR>MET
		15824 A>G	Polimorfismo	CYB	THR>ALA
	2	3972 A>G	Polimorfismo	ND1	LEU>LEU
		7067 T>C*	Mutación	CO1	LEU>LEU
		3	1467 T/A	Heteroplasmia	RNR1
	16302 A/C		Heteroplasmia	HV1	
	16270 C>T		Polimorfismo	HV1	
OBESIDAD	4	6152T >C	polimorfismo	CO1	VAL>VAL
		10170 G>A	Polimorfismo	ND3	GLU>GLU
		15781 C>T*	Mutación	CYB	TYR>PHE
	5	5040 A>C*	Mutación	ND2	MET>LEU
		5067 A>G*	Mutación	ND2	MET>VAL
		5654 T>C	Mutación	MT-TA	
		7124 A>G	Polimorfismo	CO1	GLY>GLY
		11016 G>A*	Polimorfismo	ND4	SER>ASP
		11435 G>A	Mutación	ND4	ALA>THR
	6	6895 A>G*	Mutación	CO1	ASN>SER
		7241 A>G	Polimorfismo	CO1	ALA>ALA

Tabla 4. Variantes encontradas en los grupos experimentales con CaM. En la tabla se muestran los grupos de IMC con obesidad y normal; La posición de la variante en el DNAm_t así como el tipo de cambio, ya sea, polimorfismo o mutación, el gen donde se encontró dicho cambio y el tipo de aminoácido que sufrió el cambio. Los cambios que no se encuentran reportados en las bases de datos se identifican con el símbolo (*).

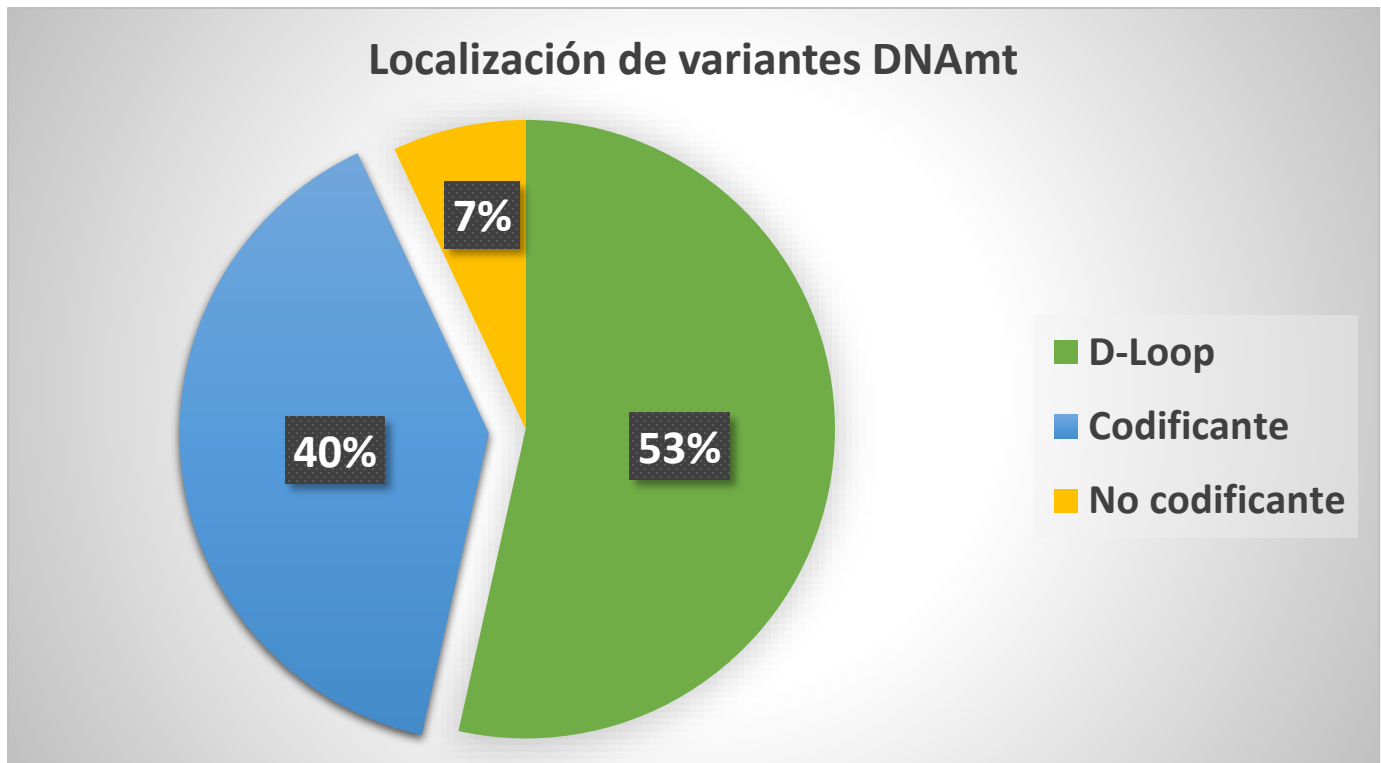


Grafico 1. Porcentaje de variantes localizadas en el DNAm. El 53% de las variantes se localizan en la región conocido como D-Loop la cual tiene secciones implicadas en la transcripción como replicación de la molécula de DNAm, el 40% de las variantes se localizaron en la fracción codificante para las diferentes subunidades de la cadena transportadora de electrones; solo el 7% se las variantes observadas se encuentran en genes no codificantes como son en RNA de transferencia de ribosomales.

X. Discusión

El Fondo de Investigación Mundial del Cáncer ha estimado, que alrededor del 30-40% de los diferentes tipos de cánceres se pueden atribuir a una gran variedad de factores como son: una alimentación inadecuada, inactividad física y a la presencia de incremento ponderal. En relación con aquellos tipos de cánceres en los cuales se ha postulado que la obesidad influye en su morbilidad y/o mortalidad, el CaM ocupa un lugar preponderante. Este cáncer es la principal causa de muerte entre las mujeres tanto en países de primer mundo como, en vías de desarrollo; dentro de este último grupo se incluye México. Se ha estimado que en nuestro país, solo el 10% de los casos de CaM son diagnosticados en etapa I, lo que se traduce en una elevación de costos de atención promedio por año-paciente mientras más tardía es la detección. Aunado a lo anterior, el aumento en la prevalencia de la obesidad y de que las mujeres con obesidad al momento del diagnóstico de CaM se asocia con un mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad; esto hace imperioso el identificar marcadores de predisposición y de progresión de la enfermedad.

En la actualidad, diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han evidenciado una importante participación de la bioenergética mitocondrial en el desarrollo y progresión del CaM no hereditario; sin embargo, son muy pocos los estudios en los que se ha realizado un abordaje genómico para caracterizar mutaciones somáticas presentes en tejido mamario tumorogénico de mujeres con sobrepeso u obesidad.

De tal forma, que tomando en consideración de que a la fecha son pocos los estudios en los que se ha analizado el DNAmT en CaM desde un punto de vista

genómico, el interés de nuestro grupo fue el realizar un análisis genómico en el DNAMt de mujeres mestizas-mexicanas con peso normal u obesidad.

La molécula de DNAMt, al estar sometida a un ambiente altamente oxidativo, presenta una alta tasa mutacional en comparación con la molécula de DNA nuclear (Carew et al. 2002); esto aunado a la participación de la mitocondria en la formación de moléculas de ATP tiene vital importancia en diversas enfermedades, donde los procesos metabólicos y bioenergéticos se ven altamente implicados como es el caso de la obesidad y el CaM (Ralph, Rodríguez-Enríquez, Neuzil, and Moreno-Sánchez 2010; Barger and Plas 2010; Yang et al. 2000). La molécula de DNAMt al tener forma circular tiene semejanzas con la molécula de DNA bacteriana, lo anterior implica que a diferencia del nuclear, la transcripción de genes mitocondriales es de forma policistrónica; por lo que, al iniciar la transcripción no solo los genes codificantes de péptidos son sintetizados, sino además, todos los genes no codificantes como son las RNAt para los diversos aminoácidos y los RNA ribosomales necesarios para la síntesis proteica. Todo esto involucra que, si existen modificaciones en el DNAMt antes del proceso de transcripción; los procesos de síntesis, elongación proteica, plegamiento y función bioquímica de las diversas subunidades de la CTE se verán modificadas.

De igual importancia a la fracción codificante para péptidos y RNA de transferencia y ribosomales, el DNAMt tiene una sección conocida como D-Loop, la cual presenta una serie de sitios implicados en los procesos de replicación de transcripción mitocondrial de las cadenas pesadas (H) y ligeras (L) (Taanman 1999). En esta región se encuentra la zona hipervariable (HV1) que se considera como sitio caliente (Hot Spot) por su alta tasa mutacional (Y. Wang et al. 2005).

A diferencia de su contraparte nuclear, el DNAMt es una molécula multicopias, la mayoría de sujetos presentan un DNAMt homoplasmico; es decir, que solo presenta un tipo de DNA en todo su material genético. Sin embargo, estudios sugieren que en diversos tipos de cáncer y otros tipos de enfermedades metabólicas, la existencia de dos o más variantes alélicas (heteroplasmia) en este caso, existe un porcentaje de DNAMt que contiene una mutación. Estas heteroplasmias han sido fuertemente asociadas a diversas enfermedades mitocondriales como son: esclerosis múltiple, neurodegeneración; además se han encontrado en diversos tipos de cáncer como en el de próstata y mama. (Avital et al. 2012; Ghatak et al. 2014; Jakupciak, Maragh, et al. 2008; Keogh and Chinnery 2015; Souren et al. 2016; Petros et al. 2005)

De igual forma existen estudios en donde describen la presencia de variantes mitocondriales asociadas al CaM (Jakupciak, Maggrah, et al. 2008; Grzybowska-szatkowska et al. 2014); sin embargo, éstos, presentan limitantes, ya que la mayoría de estos estudios, realizan la búsqueda de variantes solo en loci específicos de todo el genoma mitocondrial; por lo que él solo secuenciar genes específicos, se pierde información que podría ser crucial para entender el proceso canceroso a nivel de este organelo.

La tecnología de secuenciación masiva y de nueva generación permite el análisis de una gran cantidad de bases, sin embargo, al ser un proceso relativamente nuevo, el tiempo de procesamiento así como el costo de reactivos es elevado. Affymetrix por medio de su microarreglo de secuencia (MitoChip v2.0) diseñado en conjunto con Zhou et al. (2006), permite el procesamiento de muestras

simultáneamente, disminuyendo de esta forma, la cantidad de reactivos y tiempo invertidos para la fase experimental.

En nuestro caso, nos encontramos con algunas limitantes con la tecnología de microarreglos; por un lado, al permitir el análisis tanto de las regiones codificantes y con la versión 2.0 del Mitochip, se permitió el análisis de la región de control D-Loop; facilitando la obtención de toda la secuencia con pocas reacciones de PCR, contrario a lo ocurrido en las reacciones de secuencia convencionales, donde se necesita una gran cantidad de oligonucleótidos a corta distancia para lograr secuenciar todo el genoma mitocondrial; sin embargo con el Mitochip v2.0 esto se logra a un elevado costo por microarreglo.

Otro obstáculo es el software proporcionado por la casa comercial, la interface que se ofrece para el análisis no fue diseñado en primera instancia para este tipo de arreglo, por lo que se deben de modificar los estándares con el objetivo de permitir un buen análisis de los datos; este cambio en los parámetros del programa tiene como consecuencia que un porcentaje de los datos disminuyan en certeza (Xie et al. 2011). Además el usarse un programa modificado para los microarreglos mitocondriales, parte de las sondas no son analizadas de forma automática, por lo que en diversos casos, donde estos microarreglos han sido usados; esos datos no son tomados en cuenta por la falta de herramientas de análisis. Siendo una pérdida de información importante para las investigaciones. (Zamzami et al. 2011; Thieme et al. 2009)

Con base en esa tecnología, nosotros al utilizar los MitoChip v2.0 para analizar el genoma mitocondrial completo del tejido tumoral de mujeres con CaM no hereditario y obesidad y compararlo con las mujeres con las mismas características solo que con un IMC que corresponde a peso normal. Lo anterior, con el fin de determinar si las mujeres con CaM y obesidad, presentan diferentes o una mayor cantidad de mutaciones somáticas.

En relación a nuestros resultados, encontramos múltiples variantes genéticas, tanto polimorfismos como mutaciones germinales y somáticas, en el DNAMt tanto de las mujeres con IMC normal como aquellas con obesidad. El análisis con el programa GSEQ 4.1, nos permitió el análisis de 16544 pb con la capacidad de búsqueda de heteroplasmas que podrían encontrarse en las diversas muestras.

El 40% de las variantes se hallaron fuera del D-Loop de la molécula de DNAMt, estas variantes de genes codificantes podrían estar implicadas en la desregulación de la CTE, por cambios en la función bioquímica de los complejos I, III y IV mitocondriales. El 53% de las variantes se encontraron en las regiones hipervariables (HV1 y HV2) las cuales se localizaron en las posiciones 16024- 16383 y 57-372 respectivamente (Stoneking 2000). Finalmente, solo el 7% se localizaron en regiones no codificantes del DNAMt; estos genes no codificantes, son los responsables de los diversos RNA de transferencia y ribosomales.

Con respecto a las variantes genéticas del grupo de mujeres con IMC normal, encontramos 1 mutación somática en el gen ND5 (13934 C>T, Tabla 4), esta mutación, de acuerdo a la base de datos del MITOMAP (<http://www.mitomap.org>),

hasta el momento no ha sido reportada. Diversos estudios demuestran que mutaciones en ND5 podrían estar implicados en el proceso tumoral en etapas tempranas de la enfermedad; estudios han encontrado mutaciones de ND5 en cáncer de riñón pulmón, vejiga, mama entre otros (Parrella et al. 2001; Li et al. 2014; Jakupciak, Maragh, et al. 2008). Esta mutación somática en ND5 encontrada por nuestro grupo en tejido tumoral mamario, sustituye una tirosina, que es un aminoácido polar con características hidrofóbicas por el grupo fenol presente en su estructura química; por una metionina, el cual es un aminoácido esencial no polar, al presentar los grupos α -amino y α -carboxilo. La sustitución de un aminoácido con características bioquímicas tan diferentes, podría estar modificando la funcionalidad de ND5 en el tejido tumoral; esto a través de, la modificación de su estructura proteica terciaria; cambios en su estructura tridimensional podrían alterar la unión con las otras subunidades del complejo I enzimático de la CTE. Se ha descrito que alteraciones en CTE están relacionadas con un aumento en el estrés oxidativo de la mitocondria (Turrens 2003; Mantena et al. 2008; Halliwell 2007). Este cambio en una sola subunidad, en este caso ND5, puede ser el evento inicial en la progresión del CaM a través de la CTE, ya que el aumento del estrés oxidativo a largo plazo estaría incidiendo en la molécula de DNAm modificando una mayor cantidad de bases del genoma y aumentando las diversas especies de ROS; esto a su vez, perpetuando las alteraciones genéticas en la estirpe del tejido mamario, responsable en etapas más avanzadas de la enfermedad de la invasión y metástasis.

Por otra parte, también encontramos una mutación germinal de CO1 en la posición 7067 T>C, no reportada en las diferentes bases de datos; esta mutación de herencia materna es silente; ya que no existe cambio en el codón codificante para leucina.

Una de las ventajas que tiene la tecnología de microarreglos de secuencia dada por Affymetrix, es la detección de dos tipos de modelos genómicos (homocigoto y heterocigoto); gracias a esto, se pudieron detectar mutaciones en dos sitios en D-Loop, en las posición 1467 T/A y 16302 A/C, tanto del tejido tumoral como sanguíneo. En principio el DNAm_t es una macromolécula multicopias homoplasmica (Taanman 1999); al darse una mutación en alguna molécula de material genético, esta puede ser eliminada por la célula; sin embargo, existe la posibilidad que esta mutación presente alguna ventaja para los procesos implicados de la mitocondria (Jakupciak et al. 2005; Carew et al. 2002). En este caso, durante el proceso replicativo del DNAm_t, esta mutación podría aumentar en proporción en comparación con la genoma sin alterar; dependiendo de la localización de esta modificación, por lo que habría la posibilidad de modificar la supervivencia y crecimiento celular (Ralph, Rodríguez-Enríquez, Neuzil, and Moreno-Sánchez 2010; Fleury, Mignotte, and Vayssière 2002).

Las heteroplasmias que encontramos en nuestra paciente se encuentran en la región de control del DNAm_t, la cual no codifica para ningún gen; sin embargo, en esta zona, se unen los diferentes factores de transcripción y de la replicación (Fernández-Silva, Enriquez, and Montoya 2003). Las alteraciones en la secuencia

de control de DNAm^t dadas por la heteroplasma sugieren que presentan una ventaja para el proceso carcinogénico en etapas tempranas de la enfermedad.

Los polimorfismos 9181 A>G (Marzuki et al. 1991; Bedford 2012; Bedford, Yacobi, and Garza 2013), 10001 T>C (Paterno and Downs 1991), 15824 A>G (Herrnstadt et al. 2002), 3972 A>G (Kumar et al. 2011), 16270 C>T se han reportado previamente. en México, existen pocos estudios de genética de poblaciones donde se vea la relación de los diversos polimorfismos en la población mestiza-mexicana con enfermedades como el cáncer u otras enfermedades (Guardado-Estrada et al. 2009; Kumar et al. 2011; Hall and Smith 1991; Torroni et al. 1994), sin embargo, el estudio de estos polimorfismos en la población mestizo-mexicana podría servir como punto de referencia para el proceso de carcinogénesis en CaM u otras enfermedades degenerativas donde la mitocondria tenga relación.

A diferencia del grupo con IMC normal, en nuestro grupo de mujeres se encontraron diversas mutaciones en las regiones codificantes que podrían estar impactando en el proceso tumoral.

La mutación germinal de CYB 15781 C>T modifica la función de la CTE, la sub unidad de CYB es la única del complejo III mitocondrial que es sintetizada por la mitocondria. La subunidad CYB está relacionada con el paso de electrones a través de todo el complejo proteico; el cambio en la posición dos del triplete para TYR sustituyo a este aminoácido por la PHE; estos dos aminoácidos forman parte del grupo de aminoácidos aromáticos por el grupo bencénico que los compone. A pesar de presentar características en estructura semejantes; el plegamiento de la cadena peptídica para la formación terciaria del CYB podría verse modificada, ya

que la tirosina es un aminoácido parcialmente polar, mientras que la fenilalanina es un aminoácido sin carga. Estudios bioquímicos podrían determinar si esta mutación germinal en realidad altera el funcionamiento del complejo III mitocondrial.

Las mutaciones encontradas en las subunidades ND2 y ND4, podrían estar modifican la estructura y función del complejo I de la CTE, este complejo multienzimático es el más grande de la CTE, y también el responsable del transporte de electrones a través de la membrana interna mitocondrial, generando el gradiente electroquímico necesario para iniciar la producción de ATP.

El complejo IV mitocondrial es el responsable de la función catalítica final de la CTE; este es uno de los procesos de mayor regulación de la fosforilación oxidativa, la actividad deficiente de este complejo se ha asociado a una variedad de enfermedades como son: accidentes cerebrovasculares, cardioencefalopatías, falla hepática, entre otras.

La existencia una mutación somática en la subunidad del último complejo enzimático tendría vital importancia por la modificación estructural de esta subunidad. El complejo IV mitocondrial no solo está compuesto por genes mitocondriales; si no además, están presentes una variedad de subunidades que son codificadas fuera de este organelo, sin embargo las mutaciones que se han encontrado en los genes nucleares, parecen no afectar la funcionalidad de este complejo. Las diversas enfermedades donde se ha visto relación con el complejo IV tienen la particularidad de ser enfermedades degenerativas; al igual que el cáncer.

Las mutaciones somáticas que encontramos en estas subunidades se encuentran en la zona conocida como bomba de protones; al verse modificado el proceso de fosforilación oxidativa, se estaría generando un aumento en la producción de ROS por el escape de electrones (Ralph, Rodríguez-Enríquez, Neuzil, Saavedra, et al. 2010). En este estudio se pudo observar que el CaM en mujeres con obesidad, presentan mutaciones somáticas mitocondriales que podrían estar relacionadas con el proceso tumoral, al modificar el balance bioenergética y oxidativo de la mitocondria.

La propuesta de las diferentes marcas tumorales que presentan las células tumorales (Hanahan and Weinberg 2011), nos permite relacionar los diferentes procesos que están en conjunción durante la carcinogénesis, es de especial interés el hecho que, la mitocondria participa de manera activa en las diferentes marcas tumorales: en las modificaciones bioenergéticas necesarias durante el crecimiento celular (WARBURG 1956), la inestabilidad genómica (Richard et al. 2000), adquisición de mecanismos proliferativos y de evasión de la muerte celular (Fleury, Mignotte, and Vayssière 2002); entre otros procesos. Por lo que no es de extrañar que cambios en su genoma modifiquen de manera crítica el proceso neoplásico.

XI. Conclusiones

- La comparación entre las muestras de tejido sanguíneo y tumoral para el protocolo de secuenciación por microarreglos, permitió la disertación de las variantes encontradas. Distinguiendo entre mutaciones somáticas y polimorfismos.
- Las mutaciones somáticas encontradas en los diversos genes mitocondriales podrían estar impactando en el establecimiento del proceso tumoral en etapas tempranas del CaM.
- Las mujeres con obesidad presentaron diversas mutaciones somáticas, que en estructura y función de las subunidades de los diversos complejos enzimáticos tendrían mayor impacto en el proceso de estrés oxidativo.
- Las mujeres con obesidad presentaron diversas mutaciones en DNAMt no reportadas, lo que sugiere que la presencia de un IMC $<30 \text{ kg/m}^2$ en mujeres con CaM tiene no solo implicaciones metabólicas y bioenergéticas, si no genéticas.
-

XII. Perspectivas

- Utilizar los datos obtenidos de los microarreglos en el desarrollo de un proyecto poblacional en busca de las variantes encontradas, con el fin de determinar si son propias de las poblaciones mestizo-mexicanas.
- Validar las mutaciones encontradas por medio de reacciones de secuenciación
- Realizar pruebas de funcionalidad en cultivo celular de CaM para determinar si las mutaciones somáticas modifican la CTE mitocondrial.
- Realizar pruebas tanto genéticas, como bioquímicas de las mutaciones mitocondriales en el proceso transformante de las células mamarias.
- Demostrar por modelos *in silico* si las mutaciones somáticas encontradas modifican la funcionalidad de la CTE, permitiendo identificar el proceso bioquímico modificado en estas pacientes con CaM.

XIII. Referencias

- Affymetrix Inc. 2005. "Affymetrix GeneChip Sequence Analysis Software User Guide."
- Alam, Tanfis Istiaq, Tomotake Kanki, Tsuyoshi Muta, Koutarou Ukaji, Yoshito Abe, Hiroshi Nakayama, Koji Takio, Naotaka Hamasaki, and Dongchon Kang. 2003. "Human Mitochondrial DNA Is Packaged with TFAM." *Nucleic Acids Research* 31 (6): 1640–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12626705>.
- Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. L. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, et al. 1981. "Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome." *Nature* 290 (5806). Nature Publishing Group: 457–65. doi:10.1038/290457a0.
- Avital, Gal, Mor Buchshtav, Ilia Zhidkov, Jeanette Tuval, Sarah Dadon, Eitan Rubin, Dan Glass, Timothy D. Spector, and Dan Mishmar. 2012. "Mitochondrial Dna Heteroplasmy in Diabetes and Normal Adults: Role of Acquired and Inherited Mutational Patterns in Twins." *Human Molecular Genetics* 21 (19): 4214–24. doi:10.1093/hmg/dds245.
- Bai, Ren-Kui K., Suzanne M. Leal, Daniel Covarrubias, Aiyi Liu, and Lee-Jun C J C Wong. 2007. "Mitochondrial Genetic Background Modifies Breast Cancer Risk." *Cancer Research* 67 (10): 4687–94. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3554.
- Barcellos-Hoff, Mary Helen, David Lyden, and Timothy C Wang. 2013. "The Evolution of the Cancer Niche during Multistage Carcinogenesis." *Nature Reviews. Cancer* 13 (7). Nature Publishing Group: 511–18. doi:10.1038/nrc3536.
- Barger, Jennifer F, and David R Plas. 2010. "Balancing Biosynthesis and Bioenergetics: Metabolic Programs in Oncogenesis." *Endocrine-Related Cancer* 17 (4): R287–304. doi:10.1677/ERC-10-0106.
- Bedford, Felice L. 2012. "Sephardic Signature in Haplogroup T Mitochondrial DNA." *European Journal of Human Genetics : EJHG* 20 (4): 441–48. doi:10.1038/ejhg.2011.200.
- Bedford, Felice L, Doron Yacobi, and Gary Felix and Federico M Garza. 2013. "Clarifying Mitochondrial DNA Subclades of T2e from Mideast to Mexico." *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology* 2013. OMICS International. doi:10.4172/2329-9002.1000121.
- Bernhard, A B, V M Scabim, M P Serafim, A V Gadducci, M A Santo, and R de Cleva. 2016. "Modified Body Adiposity Index for Body Fat Estimation in Severe Obesity." *Journal of Human Nutrition and Dietetics : The Official Journal of the British Dietetic Association*, August. doi:10.1111/jhn.12404.
- Bianchi, M S, N O Bianchi, and G Bailliet. 1995. "Mitochondrial DNA Mutations in Normal and Tumor Tissues from Breast Cancer Patients." *Cytogenetics and Cell Genetics* 71 (1): 99–103. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7606938>.
- Brown, Kristy A, and Evan R Simpson. 2012. "Obesity and Breast Cancer: Mechanisms and Therapeutic Implications." *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)* 4: 2515–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22652657>.

- Cann, Rebecca L, Mark Stoneking, and Allan C Wilson. 1987. "Mitochondrial DNA and Human Evolution." *Nature*. doi:10.1038/325031a0.
- Canter, Jeffrey A, Asha R Kallianpur, Fritz F Parl, and Robert C Millikan. 2005. "Mitochondrial DNA G10398A Polymorphism and Invasive Breast Cancer in African-American Women." *Cancer Research* 65 (17): 8028–33. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1428.
- Carew, Jennifer S, Peng Huang, O Warburg, O Warburg, DM Hockenbery, RM Schwartz, MO Dayhoff, et al. 2002. "Mitochondrial Defects in Cancer." *Molecular Cancer* 1 (1). BioMed Central: 9. doi:10.1186/1476-4598-1-9.
- Carrer, Michele, Ning Liu, Chad E Grueter, Andrew H Williams, Madlyn I Frisard, Matthew W Hulver, Rhonda Bassel-Duby, and Eric N Olson. 2012. "Control of Mitochondrial Metabolism and Systemic Energy Homeostasis by microRNAs 378 and 378*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (38): 15330–35. doi:10.1073/pnas.1207605109.
- Cavallo, Federica, Carla De Giovanni, Patrizia Nanni, Guido Forni, and Pier Luigi Lollini. 2011. "2011: The Immune Hallmarks of Cancer." In *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60:319–26.
- Chen, Junjian Z, Neriman Gokden, Graham F Greene, Perkins Mukunyadzi, and Fred F Kadlubar. 2002. "Extensive Somatic Mitochondrial Mutations in Primary Prostate Cancer Using Laser Capture Microdissection Advances in Brief Extensive Somatic Mitochondrial Mutations in Primary Prostate Cancer Using." *Cancer Research*, no. 62: 6470–74.
- Cheng, Meng, Zhanjun Guo, Haiping Li, Zheng Li, Chunxiao Li, and Cuizhi Geng. 2014. "Identification of Sequence Polymorphisms in the Mitochondrial Displacement Loop as Risk Factors for Sporadic and Familial Breast Cancer." *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35 (5): 4773–77. doi:10.1007/s13277-014-1626-5.
- Cohen, Deborah A. 2008. "Neurophysiological Pathways to Obesity: Below Awareness and beyond Individual Control." *Diabetes* 57 (7): 1768–73. doi:10.2337/db08-0163.
- Colotta, Francesco, Paola Allavena, Antonio Sica, Cecilia Garlanda, and Alberto Mantovani. 2009. "Cancer-Related Inflammation, the Seventh Hallmark of Cancer: Links to Genetic Instability." *Carcinogenesis* 30 (7): 1073–81. doi:10.1093/carcin/bgp127.
- Cutler, David J., Michael E. Zwick, Minerva M. Carrasquillo, Christopher T. Yohn, Katherine P. Tobin, Carl Kashuk, Debra J. Mathews, et al. 2001. "High-Throughput Variation Detection and Genotyping Using Microarrays." *Genome Research* 11 (11): 1913–25. doi:10.1101/gr.197201.
- Czarnecka, Anna M, Tomasz Krawczyk, Marek Zdrozny, Jan Lubiński, Rebecca S Arnold, Wojciech Kukwa, Anna Scińska, Paweł Golik, Ewa Bartnik, and John A Petros. 2010. "Mitochondrial NADH-Dehydrogenase Subunit 3 (ND3) Polymorphism (A10398G) and Sporadic Breast Cancer in Poland." *Breast Cancer Research and Treatment* 121 (2): 511–18. doi:10.1007/s10549-009-0358-5.
- DiMauro, Salvatore, and Eric A Schon. 2003. "Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases." *The New England Journal of Medicine* 348 (26): 2656–68.

doi:10.1056/NEJMra022567.

Devlin Thomas M. Bioquímica con aplicaciones clínicas 4 edición.

Fernández-Sánchez, Alba, Eduardo Madrigal-Santillán, Mirandeli Bautista, Jaime Esquivel-Soto, Ángel Morales-González, Cesar Esquivel-Chirino, Irene Durante-Montiel, Graciela Sánchez-Rivera, Carmen Valadez-Vega, and José A. Morales-González. 2011. "Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity." *International Journal of Molecular Sciences* 12 (5): 3117–32. doi:10.3390/ijms12053117.

Fernández-Silva, Patricio, José A Enriquez, and Julio Montoya. 2003. "Replication and Transcription of Mammalian Mitochondrial DNA." *Experimental Physiology* 88 (1): 41–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525854>.

Fleury, Christophe, Bernard Mignotte, and Jean-Luc Vayssière. 2002. "Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Cell Death Signaling." *Biochimie* 84 (2-3): 131–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12022944>.

Fliiss, M S, H Usadel, O L Caballero, L Wu, M R Buta, S M Eleff, J Jen, and D Sidransky. 2000. "Facile Detection of Mitochondrial DNA Mutations in Tumors and Bodily Fluids." *Science (New York, N.Y.)* 287 (5460): 2017–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10720328>.

Floor, S??bastien L., Jacques E. Dumont, Carine Maenhaut, and Eric Raspe. 2012. "Hallmarks of Cancer: Of All Cancer Cells, All the Time?" *Trends in Molecular Medicine* 18 (9): 509–15. doi:10.1016/j.molmed.2012.06.005.

Formentini, Laura, Inmaculada Martínez-Reyes, and José M Cuezva. 2010. "The Mitochondrial Bioenergetic Capacity of Carcinomas." *IUBMB Life* 62 (7): 554–60. doi:10.1002/iub.352.

Ghatak, Souvik, Doris Lallawmzuali, Lalmawia, Ricky Sapkota, Zothanpuia, Jeremy L. Pautu, Rajendra Bose Muthukumar, and Nachimuthu Senthil Kumar. 2014. "Mitochondrial D-Loop and Cytochrome Oxidase C Subunit I Polymorphisms among the Breast Cancer Patients of Mizoram, Northeast India." *Current Genetics* 60 (3): 201–12. doi:10.1007/s00294-014-0425-2.

Gorodezky, C, C Alaez, M N Vázquez-García, G de la Rosa, E Infante, S Balladares, R Toribio, E Pérez-Luque, and L Muñoz. 2001. "The Genetic Structure of Mexican Mestizos of Different Locations: Tracking Back Their Origins through MHC Genes, Blood Group Systems, and Microsatellites." *Human Immunology* 62 (9): 979–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11543900>.

Grattagliano, Ignazio, Ornella de Bari, Telma C. Bernardo, Paulo J. Oliveira, David Q.-H. Wang, and Piero Portincasa. 2012. "Role of Mitochondria in Nonalcoholic Fatty Liver Disease-from Origin to Propagation." *Clinical Biochemistry* 45 (9): 610–18. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.03.024.

Grzybowska-szatkowska, Ludmila, Brygida Slaska, Jolanta Rzymowska, Anna Brzozowska, and Bolesaw Florianczyk. 2014. "Novel Mitochondrial Mutations in the ATP6 and ATP8 Genes in Patients with Breast Cancer." *Molecular Medicine Reports* 10 (4): 1772–78. doi:10.3892/mmr.2014.2471.

Guardado-Estrada, Mariano, Eligia Juarez-Torres, Ingrid Medina-Martinez, Ana Wegier, Antonio Macías, Guillermo Gomez, Fernando Cruz-Talonia, et al. 2009. "A Great

- Diversity of Amerindian Mitochondrial DNA Ancestry Is Present in the Mexican Mestizo Population." *Journal of Human Genetics* 54 (12). Nature Publishing Group: 695–705. doi:10.1038/jhg.2009.98.
- Guh, Daphne P, Wei Zhang, Nick Bansback, Zubin Amarsi, C Laird Birmingham, and Aslam H Anis. 2009. "The Incidence of Co-Morbidities Related to Obesity and Overweight: A Systematic Review and Meta-Analysis." *BMC Public Health* 9: 88. doi:10.1186/1471-2458-9-88.
- Guo, Zhanjun, Shengnan Zhao, Haiyan Fan, Yanming Du, Yufei Zhao, and Guiying Wang. 2016. "Identification of Sequence Polymorphisms in the D-Loop Region of Mitochondrial DNA as a Risk Factor for Colon Cancer." *Mitochondrial DNA. Part A. DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, May, 1–2. doi:10.3109/19401736.2014.1003920.
- Hall, H. G., and D. R. Smith. 1991. "Distinguishing African and European Honeybee Matrilineages Using Amplified Mitochondrial DNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (10). National Acad Sciences: 4548–52. doi:10.1073/pnas.88.10.4548.
- Halliwel, Barry. 2007. "Oxidative Stress and Cancer: Have We Moved Forward?" *The Biochemical Journal* 401 (1): 1–11. doi:10.1042/BJ20061131.
- Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. "Hallmarks of Cancer: The next Generation." *Cell* 144 (5). Elsevier Inc.: 646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Herrnstadt, Corinna, Joanna L Elson, Eoin Fahy, Gwen Preston, Douglass M Turnbull, Christen Anderson, Soumitra S Ghosh, et al. 2002. "Reduced-Median-Network Analysis of Complete Mitochondrial DNA Coding-Region Sequences for the Major African, Asian, and European Haplogroups." *American Journal of Human Genetics* 70 (5): 1152–71. doi:10.1086/339933.
- Hock, M B, and A Kralli. 2009. "Transcriptional Control of Mitochondrial Biogenesis and Function." *Annu Rev Physiol* 71: 177–203. doi:10.1146/annurev.physiol.010908.163119.
- Jakupciak, John P, Andrea Maggrah, Samantha Maragh, Jennifer Maki, Brian Reguly, Katrina Maki, Roy Wittock, et al. 2008. "Facile Whole Mitochondrial Genome Resequencing from Nipple Aspirate Fluid Using MitoChip v2.0." *BMC Cancer* 8: 95. doi:10.1186/1471-2407-8-95.
- Jakupciak, John P, Samantha Maragh, Maura E Markowitz, Alissa K Greenberg, Mohammad O Hoque, Anirban Maitra, Peter E Barker, et al. 2008. "Performance of Mitochondrial DNA Mutations Detecting Early Stage Cancer." *BMC Cancer* 8: 285. doi:10.1186/1471-2407-8-285.
- Jakupciak, John P, Wendy Wang, Maura E Markowitz, Delphine Ally, Michael Coble, Sudhir Srivastava, Anirban Maitra, Peter E Barker, David Sidransky, and Catherine D O'Connell. 2005. "Mitochondrial DNA as a Cancer Biomarker." *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD* 7 (2). American Society for Investigative Pathology and Association for Molecular Pathology: 258–67. doi:10.1016/S1525-1578(10)60553-3.
- Janssen, Ian, Peter T Katzmarzyk, and Robert Ross. 2004. "Waist Circumference and Not Body Mass Index Explains Obesity-Related Health Risk." *The American Journal of Clinical Nutrition* 79 (3). American Society for Nutrition: 379–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14985210>.

- Katihar, Santosh K., and Syed M. Meeran. 2007. "Obesity Increases the Risk of UV Radiation-Induced Oxidative Stress and Activation of MAPK and NF- κ B Signaling." *Free Radical Biology and Medicine* 42 (2): 299–310. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.10.049.
- Keogh, Michael J, and Patrick F Chinnery. 2015. "Mitochondrial DNA Mutations in Neurodegeneration." *Biochimica et Biophysica Acta* 1847 (11): 1401–11. doi:10.1016/j.bbabo.2015.05.015.
- Kong, Desheng, Shuhong Shi, and Yanfang Li. 2015. "Single Nucleotide Polymorphisms in the D-Loop Region of Mitochondrial DNA Are Associated with Epithelial Ovarian Cancer Prognosis." *Mitochondrial DNA* 26 (6): 848–50. doi:10.3109/19401736.2013.861425.
- Kumar, Satish, Claire Bellis, Mark Zlojutro, Phillip E Melton, John Blangero, and Joanne E Curran. 2011. "Large Scale Mitochondrial Sequencing in Mexican Americans Suggests a Reappraisal of Native American Origins." *BMC Evolutionary Biology* 11: 293. doi:10.1186/1471-2148-11-293.
- Langelaan, D N, E M Bebbington, T Reddy, and J K Rainey. 2009. "Structural Insight into G-Protein Coupled Receptor Binding by Apelin." *Biochemistry* 48 (3): 537–48. doi:10.1021/bi801864b|10.1021/bi801864b [pii].
- Li, Lin Hai, Tao Kang, Lidan Chen, Weiyun Zhang, Yang Liao, Jianyun Chen, and Yuling Shi. 2014. "Detection of Mitochondrial DNA Mutations by High-Throughput Sequencing in the Blood of Breast Cancer Patients." *International Journal of Molecular Medicine* 33 (1): 77–82. doi:10.3892/ijmm.2013.1559.
- Ma, Zhongmin A. 2012. "The Role of Peroxidation of Mitochondrial Membrane Phospholipids in Pancreatic β -Cell Failure." *Current Diabetes Reviews* 8 (1): 69–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22414059>.
- Maggrah, Andrea, Kerry Robinson, Jennifer Creed, Roy Wittcock, Ken Gehman, Teresa Gehman, Helen Brown, et al. 2013. "Paired Ductal Carcinoma in Situ and Invasive Breast Cancer Lesions in the D-Loop of the Mitochondrial Genome Indicate a Cancerization Field Effect." *BioMed Research International* 2013. doi:10.1155/2013/379438.
- Maitra, Anirban, Yoram Cohen, Susannah E D Gillespie, Elizabeth Mambo, Noriyoshi Fukushima, Mohammad O Hoque, Nila Shah, et al. 2004. "The Human MitoChip : A High-Throughput Sequencing Microarray for Mitochondrial Mutation Detection The Human MitoChip : A High-Throughput Sequencing Microarray for Mitochondrial Mutation Detection." *Genome Research*, 812–19. doi:10.1101/gr.2228504.
- Majed, Bilal, Thierry Moreau, Kamel Senouci, Rémi J Salmon, Alain Fourquet, and Bernard Asselain. 2008. "Is Obesity an Independent Prognosis Factor in Woman Breast Cancer?" *Breast Cancer Research and Treatment* 111 (2): 329–42. doi:10.1007/s10549-007-9785-3.
- Mantena, Sudheer K., Adrienne L. King, Kelly K. Andringa, Heather B. Eccleston, and Shannon M. Bailey. 2008. "Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Alcohol- and Obesity-Induced Fatty Liver Diseases." *Free Radical Biology and Medicine* 44 (7): 1259–72. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.029.
- Marchesini, Giulio, Simona Moscatiello, Silvia Di Domizio, and Gabriele Forlani. 2008.

- “Obesity-Associated Liver Disease.” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93 (11 SUPPL. 1): 74–80. doi:10.1210/jc.2008-1399.
- Marzuki, S, A S Noer, P Lertrit, D Thyagarajan, R Kapsa, P Utthanaphol, and E Byrne. 1991. “Normal Variants of Human Mitochondrial DNA and Translation Products: The Building of a Reference Data Base.” *Human Genetics* 88 (2): 139–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1757091>.
- Mithani, Suhail K, Chunbo Shao, Marietta Tan, Ian M Smith, Joseph A Califano, Adel K El-Naggar, and Patrick K Ha. 2009. “Mitochondrial Mutations in Adenoid Cystic Carcinoma of the Salivary Glands.” *PloS One* 4 (12): e8493. doi:10.1371/journal.pone.0008493.
- MITOMAP. 2012. “Revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) of the Human Mitochondrial DNA,” 12. <http://www.mitomap.org/bin/view.pl/MITOMAP/HumanMitoSeq>.
- Nichols, Hazel B, Amy Trentham-Dietz, Kathleen M Egan, Linda Titus-Ernstoff, Michelle D Holmes, Andrew J Bersch, Crystal N Holick, et al. 2009. “Body Mass Index before and after Breast Cancer Diagnosis: Associations with All-Cause, Breast Cancer, and Cardiovascular Disease Mortality.” *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 18 (5): 1403–9. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-1094.
- Notes, Gseq Release. n.d. “GSEQ 4.1.1 Release Notes,” 11–12.
- O’Rahilly, S, and I S Farooqi. 2008. “Human Obesity as a Heritable Disorder of the Central Control of Energy Balance.” *International Journal of Obesity (2005)* 32 Suppl 7 (December): S55–61. doi:10.1038/ijo.2008.239.
- Okochi, Osamu, Kenji Hibi, Takanori Uemura, Soichiro Inoue, Shin Takeda, Tetsuya Kaneko, and Akimasa Nakao. 2002. “Detection of Mitochondrial DNA Alterations in the Serum of Hepatocellular Carcinoma Patients.” *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 8 (9): 2875–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12231530>.
- Parrella, P, Y Xiao, M Fliss, M Sanchez-Cespedes, P Mazzairelli, M Rinaldi, T Nicol, et al. 2001. “Detection of Mitochondrial DNA Mutations in Primary Breast Cancer and Fine-Needle Aspirates.” *Cancer Research* 61 (20): 7623–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606403>.
- Paterno, G D, and K M Downs. 1991. “Sequence of a cDNA Encoding a Mouse Cyclin B Protein.” *Gene* 108 (2): 315–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1836195>.
- Penta, J S, F M Johnson, J T Wachsman, and W C Copeland. 2001. “Mitochondrial DNA in Human Malignancy.” *Mutation Research* 488 (2): 119–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11344040>.
- Petros, John A, Amanda K Baumann, Eduardo Ruiz-Pesini, Mahul B Amin, Carrie Qi Sun, John Hall, SoDug Lim, et al. 2005. “mtDNA Mutations Increase Tumorigenicity in Prostate Cancer.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (3): 719–24. doi:10.1073/pnas.0408894102.
- Ralph, Stephen J, Sara Rodríguez-Enríquez, Jiri Neuzil, and Rafael Moreno-Sánchez.

2010. "Bioenergetic Pathways in Tumor Mitochondria as Targets for Cancer Therapy and the Importance of the ROS-Induced Apoptotic Trigger." *Molecular Aspects of Medicine* 31 (1): 29–59. doi:10.1016/j.mam.2009.12.006.
- Ralph, Stephen J, Sara Rodríguez-Enríquez, Jiri Neuzil, Emma Saavedra, and Rafael Moreno-Sánchez. 2010. "The Causes of Cancer Revisited: 'mitochondrial Malignancy' and ROS-Induced Oncogenic Transformation - Why Mitochondria Are Targets for Cancer Therapy." *Molecular Aspects of Medicine* 31 (2): 145–70. doi:10.1016/j.mam.2010.02.008.
- Reddy, S M, M Sadim, J Li, N Yi, S Agarwal, C S Mantzoros, and V G Kaklamani. 2013. "Clinical and Genetic Predictors of Weight Gain in Patients Diagnosed with Breast Cancer." *British Journal of Cancer* 109 (4): 872–81. doi:10.1038/bjc.2013.441.
- Reisin, Efrain, and Avanelle V Jack. 2009. "Obesity and Hypertension: Mechanisms, Cardio-Renal Consequences, and Therapeutic Approaches." *The Medical Clinics of North America* 93 (3): 733–51. doi:10.1016/j.mcna.2009.02.010.
- Richard, S M, G Bailliet, G L Páez, M S Bianchi, P Peltomäki, and N O Bianchi. 2000. "Nuclear and Mitochondrial Genome Instability in Human Breast Cancer." *Cancer Research* 60 (15): 4231–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15068836>.
- Richter, C, J W Park, and B N Ames. 1988. "Normal Oxidative Damage to Mitochondrial and Nuclear DNA Is Extensive." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (17): 6465–67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3413108>.
- Sadler, Natalie C, Thomas E Angel, Michael P Lewis, Leeanna M Pederson, Lacie M Chauvigné-Hines, Susan D Wiedner, Erika M Zink, Richard D Smith, and Aaron T Wright. 2012. "Activity-Based Protein Profiling Reveals Mitochondrial Oxidative Enzyme Impairment and Restoration in Diet-Induced Obese Mice." *PloS One* 7 (10): e47996. doi:10.1371/journal.pone.0047996.
- Shoelson, Steven E., Laura Herrero, and Afia Naaz. 2007. "Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance." *Gastroenterology* 132 (6): 2169–80. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.059.
- Sotgia, Federica, Diana Whitaker-Menezes, Ubaldo E. Martinez-Outschoorn, Ahmed F. Salem, Aristotelis Tsirigos, Rebecca Lamb, Sharon Sneddon, James Hult, Anthony Howell, and Michael P. Lisanti. 2012. "Mitochondria 'fuel' breast Cancer Metabolism: Fifteen Markers of Mitochondrial Biogenesis Label Epithelial Cancer Cells, but Are Excluded from Adjacent Stromal Cells." *Cell Cycle* 11 (23): 4390–4401. doi:10.4161/cc.22777.
- Souren, Nicole Y P, Lisa A Gerdes, Tania Kümpfel, Pavlo Lutsik, Thomas Klopstock, Reinhard Hohlfeld, and Jörn Walter. 2016. "Mitochondrial DNA Variation and Heteroplasmy in Monozygotic Twins Clinically Discordant for Multiple Sclerosis." *Human Mutation*, April. doi:10.1002/humu.23003.
- Stoneking, Mark. 2000. "Hypervariable Sites in the mtDNA Control Region Are Mutational Hotspots." *The American Journal of Human Genetics*. Vol. 67. doi:10.1086/303092.
- Sui, Guoping, Shaoyu Zhou, Jean Wang, Marcia Canto, Edward E Lee, James R Eshleman, Elizabeth A Montgomery, David Sidransky, Joseph A Califano, and Anirban Maitra. 2006. "Mitochondrial DNA Mutations in Preneoplastic Lesions of the

- Gastrointestinal Tract: A Biomarker for the Early Detection of Cancer." *Molecular Cancer* 5: 73. doi:10.1186/1476-4598-5-73.
- Taanman, J W. 1999. "The Mitochondrial Genome: Structure, Transcription, Translation and Replication." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1410 (2): 103–23. doi:10.1016/S0005-2728(98)00161-3.
- Tamura, G, S Nishizuka, C Maesawa, Y Suzuki, T Iwaya, K Sakata, Y Endoh, and T Motoyama. 1999. "Mutations in Mitochondrial Control Region DNA in Gastric Tumours of Japanese Patients." *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)* 35 (2): 316–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10448277>.
- Tang, C, K Koulajian, I Schuiki, L Zhang, T Desai, A Ivovic, P Wang, et al. 2012. "Glucose-Induced Beta Cell Dysfunction in Vivo in Rats: Link between Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress." *Diabetologia* 55 (5): 1366–79. doi:10.1007/s00125-012-2474-8.
- Thieme, M, C Lottaz, H Niederstätter, W Parson, R Spang, and P J Oefner. 2009. "ReseqChip: Automated Integration of Multiple Local Context Probe Data from the MitoChip Array in Mitochondrial DNA Sequence Assembly." *BMC Bioinformatics* 10: 440. doi:10.1186/1471-2105-10-440.
- Torrioni, A, Y S Chen, O Semino, A S Santachiara-Beneceretti, C R Scott, M T Lott, M Winter, and D C Wallace. 1994. "mtDNA and Y-Chromosome Polymorphisms in Four Native American Populations from Southern Mexico." *American Journal of Human Genetics* 54 (2): 303–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8304347>.
- Torrioni, A, and D C Wallace. 1994. "Mitochondrial DNA Variation in Human Populations and Implications for Detection of Mitochondrial DNA Mutations of Pathological Significance." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 26 (3): 261–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7521328>.
- Turens, Julio F. 2003. "Mitochondrial Formation of Reactive Oxygen Species." *The Journal of Physiology* 552 (Pt 2): 335–44. doi:10.1113/jphysiol.2003.049478.
- Vucenik, Ivana, and Joseph P. Stains. 2012. "Obesity and Cancer Risk: Evidence, Mechanisms, and Recommendations." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1271 (1): 37–43. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06750.x.
- Wallace, D C. 1999. "Mitochondrial Diseases in Man and Mouse." *Science (New York, N.Y.)* 283 (5407): 1482–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066162>.
- Wang, Ding, Wei Zheng, Shao-Ming Wang, Jian-Bing Wang, Wen-Qiang Wei, Hao Liang, You-Lin Qiao, and Paolo Boffetta. 2012. "Estimation of Cancer Incidence and Mortality Attributable to Overweight, Obesity, and Physical Inactivity in China." *Nutrition and Cancer* 64 (1): 48–56. doi:10.1080/01635581.2012.630166.
- Wang, Xuan, and Nils Welsh. 2014. "Bcl-2 Maintains the Mitochondrial Membrane Potential, but Fails to Affect Production of Reactive Oxygen Species and Endoplasmic Reticulum Stress, in Sodium Palmitate-Induced β -Cell Death." *Upsala Journal of Medical Sciences* 119 (4): 306–15. doi:10.3109/03009734.2014.962714.
- Wang, Yue, Vincent W S Liu, Hextan Y S Ngan, and Phillip Nagley. 2005. "Frequent Occurrence of Mitochondrial Microsatellite Instability in the D-Loop Region of Human Cancers." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1042 (May): 123–29.

doi:10.1196/annals.1338.012.

- WARBURG, O. 1956. "On the Origin of Cancer Cells." *Science (New York, N.Y.)* 123 (3191): 309–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13298683>.
- Wieting, J Michael. 2008. "Cause and Effect in Childhood Obesity: Solutions for a National Epidemic." *The Journal of the American Osteopathic Association* 108 (10): 545–52. doi:108/10/545 [pii].
- World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC, American Institute for Cancer Research, 1997.
- Xie, Hongbo M, Juan C Perin, Theodore G Schurr, Matthew C Dulik, Sergey I Zhadanov, Joseph a Baur, Michael P King, et al. 2011. "Mitochondrial Genome Sequence Analysis: A Custom Bioinformatics Pipeline Substantially Improves Affymetrix MitoChip v2.0 Call Rate and Accuracy." *BMC Bioinformatics* 12 (1). BioMed Central Ltd: 402. doi:10.1186/1471-2105-12-402.
- Yang, S, H Zhu, Y Li, H Lin, K Gabrielson, M A Trush, and A M Diehl. 2000. "Mitochondrial Adaptations to Obesity Related Oxidant Stress." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 378 (2): 259–68. doi:10.1006/abbi.2000.1829.
- Zamzami, Mazin a, Gareth R Price, Robert W Taylor, Emma L Blakely, Iulia Oancea, Francis Bowling, and John a Duley. 2011. "Insights into N-Calls of Mitochondrial DNA Sequencing Using MitoChip v2.0." *BMC Research Notes* 4 (1). BioMed Central Ltd: 426. doi:10.1186/1756-0500-4-426.
- Zhao, Min, Patrick C. Sachs, Xu Wang, Catherine I. Dumur, Michael O. Idowu, Valentina Robila, Michael P. Francis, et al. 2012. "Mesenchymal Stem Cells in Mammary Adipose Tissue Stimulate Progression of Breast Cancer Resembling the Basal-Type." *Cancer Biology & Therapy* 13 (9): 782–92. doi:10.4161/cbt.20561.
- Zhou, Shaoyu, Keyaunoosh Kassaei, David J Cutler, Giulia C Kennedy, David Sidransky, Anirban Maitra, and Joseph Califano. 2006. "An Oligonucleotide Microarray for High-Throughput Sequencing of the Mitochondrial Genome." *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD* 8 (4). American Society for Investigative Pathology and Association for Molecular Pathology: 476–82. doi:10.2353/jmoldx.2006.060008.
- Zorzano, A, D Bach, S Pich, M Palacín, Stephen Franklin Weng, Sarah a Redsell, Judy a Swift, et al. 2008. "A Comparison of Inflammatory and Oxidative Stress Markers in Adipose Tissue from Weight-Matched Obese Male and Female Mice." *Experimental Diabetes Research* 2012 (2): 859395. doi:10.1155/2012/859395.

XIV. Anexos

A. Carta de autorización de la Comisión de Investigación y Ética



FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN
COMISIONES DE INVESTIGACIÓN Y DE ÉTICA

OFICIO NO. FMED/CI/JMO/137/2013

ASUNTO: DICTAMEN DEL PROYECTO 115/2013

DRA. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA
Profesor Titular "C" T.C.
Unidad Periférica de Investigación en Obesidad
División de Investigación
Facultad de Medicina, UNAM
Presente.

Estimada Dra. Canto Cetina:

Me complace informarle que su proyecto número 115/2013 "**Análisis del perfil mutacional de cáncer de mama no hereditario en mujeres mestizas-mexicanas con peso normal, sobrepeso u obesidad mediante un micro arreglo de DNA mitocondrial**" ha sido **APROBADO** por las Comisiones de Investigación y Ética de esta Facultad de Medicina, en su sesión ordinaria de fecha 03 de diciembre de 2013, con vigencia de 3 años a partir de la fecha de aprobación.

Para conocer el seguimiento de esta investigación, es necesario que entregue un informe anual, en la División de Investigación, tomando en cuenta esta fecha de elaboración del dictamen.

Asimismo, le solicitamos atentamente nos envíe una copia del o los artículos y/o copia de la carátula y resumen de las tesis que pudieran generarse relacionadas con el proyecto.

Sin otro particular de momento, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 03 de diciembre de 2013.

EL SECRETARIO TÉCNICO

DR. JAIME MAS OLIVA

*JMO/SCM/ET/VA/6

B. Carta de consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA

Título del protocolo: **“ANÁLISIS DEL PERFIL MUTACIONAL DEL CÁNCER DE MAMA NO HEREDITARIO EN MUJERES MESTIZAS-MEXICANAS CON PESO NORMAL, SOBREPESO U OBESIDAD MEDIANTE UN MICRO ARREGLO DE DNA MITOCONDRIAL”**

Investigador principal: Dra. Ileana Patricia Canto Cetina

Sede donde se realizará el estudio: Clínica de Obesidad; Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

Nombre del paciente: _____

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO: El cáncer mama y la obesidad son problemas de salud muy importantes en el mundo actual y particularmente en nuestro país. Actualmente, se están llevando a cabo muchos esfuerzos para identificar por qué en las mujeres con sobrepeso u obesidad que desarrollan cáncer de mama el tumor es más agresivo que en las mujeres de peso normal, con la finalidad de desarrollar pruebas y estrategias dirigidas a disminuir la mortalidad en este padecimiento. Al poderse detallar, con estudios de tipo genético como el que estamos proponiendo, las variaciones en la predisposición genética que tiene cada persona, el tipo y la intensidad de los tratamientos para prevenir o tratar el cáncer de mama, será diferente para cada mujer.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación genética que tiene como objetivo: Conocer la frecuencia y localización de mutaciones somáticas mitocondriales presentes en tejido mamario tumoral de mujeres con peso normal, sobrepeso u obesidad mediante un microarreglo de genoma completo del DNA mitocondrial, las cuales podrían no estar en el DNA de sangre periférica.

BENEFICIOS DEL ESTUDIO

En estudios realizados anteriormente por otros investigadores se ha observado que los cambios en algunos genes pueden ser el origen de algunas enfermedades.

Con este estudio, mediante el trabajo con material genético, se podría conocer por qué las mujeres que presentan sobrepeso u obesidad desarrollan tumores de mama más agresivos que aquellos que se observan en mujeres de peso normal.

Este estudio permitirá que en un futuro otras pacientes puedan beneficiarse del conocimiento obtenido, ya que a mujeres jóvenes se les podría hacer el estudio de los genes y si existiera alteración, saber que en la vida adulta van a ser presentar este tipo de enfermedades y prevenir dicha alteración.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus hábitos y sus antecedentes médicos. Para el estudio de sus genes se le tomará una muestra de sangre de 5 mililitros en una sola ocasión y también se analizarán sus genes en el tejido mamario obtenido en la cirugía.

RIESGO ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Posterior a la toma de sangre, se puede ocasionalmente presentar dolor o se puede llegar a formar una equimosis o morete en el lugar de la toma de la muestra.

ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, -aun cuando el investigador responsable no se lo solicite-, informando las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.

- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tiene derecho a una indemnización, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio.
- Usted también tiene acceso a las Comisiones de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM en caso de que tenga dudas sobre sus derechos como participante del estudio a través de:

Dr. Jaime Mas Oliva

Secretario Técnico de las Comisiones de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina.

Teléfono: 5623 2298

- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa a este documento.

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informada y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante

Fecha

Testigo

Fecha

Testigo

Fecha

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado a la Sra. _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador

Fecha

C. Carta de revocación del consentimiento informado

Título del protocolo: **“ANÁLISIS DEL PERFIL MUTACIONAL DEL CÁNCER DE MAMA NO HEREDITARIO EN MUJERES MESTIZAS-MEXICANAS CON PESO NORMAL, SOBREPESO U OBESIDAD MEDIANTE UN MICRO ARREGLO DE DNA MITOCONDRIAL”**

Investigador principal: Dra. Ileana Patricia Canto Cetina

Sede donde se realizará el estudio: Clínica de Obesidad; Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

Nombre _____ del participante: _____

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de este protocolo de investigación por las siguientes razones: _____

_____.

Firma del participante

Fecha

Testigo

Fecha

Testigo

Fecha