



## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la  
Salud

Campo del conocimiento: Investigación Clínica Experimental en Salud

Campo disciplinario: Bioquímica Clínica

### **“ANÁLISIS DEL NÚMERO DE COPIAS DEL GENOMA MITOCONDRIAL EN CÁNCER DE MAMA”**

#### **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**DIANA FLORES HUANOSTA**

TUTOR

**DRA. SILVIA JIMÉNEZ MORALES**

Instituto Nacional de Medicina Genómica

Ciudad Universitaria, CD.MX., octubre 2020



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.

## DEDICATORIA

---

*Mamá y Papá †, ustedes siempre han sido mi más grande motivación para emprender cada proyecto,*

*Damián, me apoyaste y acompañaste en esta aventura,*

*Santi, tú formaste parte de este proyecto de vida y te volviste mi más grande inspiración,*

*Hermanos: Ramón, Ignacio, Enrique, Alex y Agus, sus porras me ayudaron a seguir adelante,*

*Amigos: Aremi, David, Juan, Paco, Pau, en especial a Nallely †, por creer en mí,*

GRACIAS

## AGRADECIMIENTOS

---

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento en la convocatoria Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (FOSISS), del proyecto S0008-2016-1-272618.

A la Dra. Silvia Jiménez Morales, Tutora del proyecto, por creer en mí, por su paciencia, apoyo y asesoría en cada etapa de este proyecto.

Al Dr. Alfredo Hidalgo Miranda, Jefe del Laboratorio de Genómica del Cáncer del Instituto Nacional de Medicina Genómica, por formar parte del comité tutor de este proyecto y por sus enseñanzas.

Al Dr. Mariano Guardado Estrada, por formar parte del comité tutor de este proyecto y por sus asesorías.

A los miembros del Jurado, Dra. Yolanda Saldaña, Dra. Teresa Fortoul y Dr. Jesús Aguirre, por sus aportaciones a este trabajo.

A la Fundación del Cáncer de Mama (FUCAM), por el apoyo para la recolección de las muestras de las pacientes atendidas en dicho instituto.

A las pacientes que decidieron donar las muestras que fueron ocupadas en este proyecto, que pelean por seguir adelante contra el cáncer de mama.

A los integrantes del Laboratorio de Genómica del Cáncer, Carlos, Diego, Mire, Diana M, Mali, Ame, Jaz, Luis, Fredy, Magda, Beto, Mireya, Gaby, Vai, Eduardo, Marco, Didier, Marco F, Liz P y Liz H, su apoyo en todo momento, su compañerismo en el trabajo del día a día, su amistad y su colaboración en este proyecto fue invaluable.

## ÍNDICE

---

ÍNDICE DE TABLAS .....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vi
ABREVIATURAS .....	vii
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
Epidemiología del cáncer de mama en el mundo y en México .....	3
Cáncer de mama .....	6
Definición y etiología .....	6
Diagnóstico clínico .....	7
Clasificación inmunohistoquímica y molecular .....	7
Bases genéticas del cáncer de mama .....	9
ADN mitocondrial .....	11
Genoma mitocondrial y variantes en número de copias en cáncer de mama .....	14
JUSTIFICACIÓN .....	15
OBJETIVOS .....	16
Objetivo General .....	16
Objetivos particulares .....	16
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	17
Población de estudio .....	17
Obtención de la muestra de sangre periférica y del tumor .....	18
Extracción de ácidos nucleicos .....	19
Sangre periférica .....	19
Tejido tumoral .....	19
Evaluación de la pureza y de la integridad del ADN .....	20
Evaluación del número de copias mediante PCR en tiempo real .....	20
PCR cuantitativa en tiempo real .....	20
Diseño de oligonucleótidos.....	22
Curva estándar .....	22

Condiciones de la PCR .....	22
Análisis del número de copias del genoma mitocondrial .....	23
Análisis estadístico .....	23
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
Características de la población de estudio .....	24
Selección de oligonucleótidos y curva de disociación .....	25
Curva estándar .....	26
Número de copias del genoma mitocondrial en sangre periférica .....	28
Número de copias del genoma mitocondrial en tumores de mama .....	29
Número de copias del genoma mitocondrial por estadio clínico .....	30
Número de copias del genoma mitocondrial por subtipo inmunohistoquímico .....	32
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>34</b>
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>42</b>
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>42</b>
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>43</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Subtipos del cáncer de mama aproximación por IHQ .....	<b>9</b>
<b>Tabla 2.</b> Criterios de inclusión, exclusión y eliminación de las pacientes con cáncer de mama .....	<b>17</b>
<b>Tabla 3.</b> Distribución de subtipos inmunohistoquímicos de cáncer de mama .....	<b>24</b>
<b>Tabla 4.</b> Distribución de casos por estadio clínico .....	<b>24</b>
<b>Tabla 5.</b> Número de copias del ADNmt en sangre periférica .....	<b>28</b>
<b>Tabla 6.</b> Número de copias del ADNmt en pacientes .....	<b>29</b>
<b>Tabla 7.</b> Número de copias del ADNmt por estadio clínico .....	<b>30</b>
<b>Tabla 8.</b> Número de copias del ADNmt por subtipo inmunohistoquímico.....	<b>32</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Incidencia mundial de cáncer en población femenina.....	<b>3</b>
<b>Figura 2.</b> Mortalidad por cáncer en población femenina a nivel mundial.....	<b>4</b>
<b>Figura 3.</b> Distribución de la edad de presentación de cáncer de mama en una población de pacientes atendidos en la FUCAM .....	<b>5</b>
<b>Figura 4.</b> Distribución de la etapa clínica de diagnóstico de cáncer de mama en una población de pacientes atendidos en la FUCAM .....	<b>6</b>
<b>Figura 5.</b> Mapa genético del ADN mitocondrial humano .....	<b>12</b>
<b>Figura 6. A)</b> Célula y sus organelos, <b>B)</b> Mitocondria y <b>C)</b> ADNmt.....	<b>12</b>
<b>Figura 7.</b> Estrategia general para el análisis del número de copias del genoma mitocondrial .....	<b>18</b>
<b>Figura 8.</b> Fundamento de la PCR cuantitativa en tiempo real .....	<b>21</b>
<b>Figura 9.</b> Gráfica de la curva de disociación para los genes utilizados en el estudio. <b>A)</b> gen nuclear <i>HBB</i> y <b>B)</b> gen mitocondrial <i>ND1</i> .....	<b>25</b>
<b>Figura 10.</b> Gráfica de las curvas estándar de los genes <i>HBB</i> y <i>ND1</i> .....	<b>26</b>
<b>Figura 11.</b> Gráfica de amplificación para el gen <i>HBB</i> .....	<b>27</b>
<b>Figura 12.</b> Gráfica de amplificación para el gen <i>ND1</i> .....	<b>27</b>
<b>Figura 13.</b> Gráfica comparativa del número de copias del ADNmt en sangre entre controles y pacientes con cáncer de mama.....	<b>28</b>
<b>Figura 14.</b> Gráfica comparativa del número de copias del ADNmt en sangre y tumor de pacientes con cáncer de mama.....	<b>29</b>
<b>Figura 15.</b> Gráfica comparativa del número de copias del ADNmt en muestras de sangre de pacientes en los diferentes estadios clínicos .....	<b>31</b>
<b>Figura 16.</b> Gráfica comparativa del número de copias del ADNmt en muestras de tumor de pacientes en los diferentes estadios clínicos.....	<b>31</b>
<b>Figura 17.</b> Gráfica comparativa del número de copias del ADNmt en los diferentes subtipos de cáncer de mama en muestras de sangre de pacientes .....	<b>33</b>
<b>Figura 18.</b> Gráfica comparativa del número de copias del ADNmt en los diferentes subtipos de cáncer de mama en muestras de tumores de pacientes .....	<b>33</b>



## ABREVIATURAS

---

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNmt</b>	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
<b>AR</b>	Gen nuclear androgen receptor
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ATM</b>	Gen nuclear <i>ATM</i> serine/threonine kinase
<b>ATP</b>	Adnosin trifosfato
<b>BRCA1</b>	Gen nuclear <i>BRCA1</i> DNA repair associated
<b>BRCA2</b>	Gen nuclear <i>BRCA2</i> DNA repair associated
<b>CAG</b>	Citosina-Adenina-Guanina
<b>CDH1</b>	Gen nuclear cadherin 1
<b>CHEK2</b>	Gen nuclear checkpoint kinase 2
<b>Ct</b>	Threshold cycle o ciclo umbral
<b>ck</b>	Citoqueratinas basales
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>D-loop</b>	Región de control del ADNmt
<b>EGFR</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>FUCAM</b>	Fundación de Cáncer de Mama, A.C.
<b>HBB</b>	Gen nuclear hemoglobin subunit beta
<b>HER2</b>	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
<b>HVR</b>	Región hipervariable
<b>IDH</b>	Índice de desarrollo humano
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>Indel</b>	Inserciones/deleciones
<b>Ki-67</b>	Índice de proliferación celular
<b>LA</b>	Luminal A
<b>LB</b>	Luminal B
<b>MAP2K4</b>	Gen nuclear mitogen-activated protein kinase kinase 4
<b>μL</b>	Microlitros
<b>MTAP</b>	Gen nuclear methylthioadenosine phosphorylase

<b><i>MT-ATP6</i></b>	Gen mitocondrial mitochondrially encoded ATP synthase membrane subunit 6
<b><i>MT-ND1</i></b>	Gen mitocondrial mitochondrially encoded NADH: ubiquinone oxidoreductase core subunit 1
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PCR-TR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
<b><i>PPP2R2A</i></b>	Gen nuclear protein phosphatase 2 regulatory subunit B alpha
<b><i>RASSF1-AS1</i></b>	Gen nuclear <i>RASSF1</i> antisense RNA 1
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RE</b>	Receptor de estrógeno
<b>RP</b>	Receptor de progesterona
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido
<b><i>STK11 (LKB1)</i></b>	Gen nuclear serine/threonine kinase 11
<b>TN</b>	Triple negativo
<b>TNM</b>	Clasificación por tumor, presencia de metástasis ganglionares axilares y la presencia de metástasis a distancia
<b><i>TP53</i></b>	Gen nuclear tumor protein p53

## RESUMEN

---

**Introducción:** Desde 2006 el cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas independientemente de su estado socioeconómico. Las estimaciones en México para el año 2020 es de 16,500 nuevos casos, de los cuales, sólo el 10% de ellos se identificarán en etapas tempranas, en este sentido, el ADN mitocondrial (ADNmt) ha demostrado ser una fuente esencial de información para la identificación de biomarcadores de riesgo y pronóstico en diversas enfermedades humanas, incluyendo el cáncer de mama. **Objetivo:** Identificar variaciones en el número de copias del genoma mitocondrial asociados a la susceptibilidad de padecer cáncer de mama. **Método:** Se realizó un estudio caso-control en el que se incluyeron muestras pareadas de sangre periférica y de tumor de pacientes con cáncer de mama diagnosticadas en la Fundación de Cáncer de Mama (FUCAM), así como muestras de sangre periférica de mujeres sanas como grupo control. Mediante marcadores inmunohistoquímicos (IHQ), los tumores fueron clasificados en luminal A (LA), luminal B (LB), HER2 y triple negativo (TN). Se usaron los genes *HBB* nuclear y el *ND1* mitocondrial para la cuantificación del número de copias del ADNmt, la cual se realizó a través de PCR cuantitativo en tiempo real. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó la prueba U de Mann-Whitney. **Resultados:** Se incluyeron 66 pacientes y 63 controles cuya edad promedio fue de 53.8 años (DE= $\pm$ 11 años). De los tumores analizados encontramos que 62.12% fueron LA, 15.15% LB, 13.8% HER2 y 4.55% TN. El análisis en el número de copias del genoma mitocondrial en sangre periférica mostró que las mujeres con cáncer de mama tenían un número de copias significativamente menor en comparación con las mujeres sanas ( $p= 0.0001$ ). Sin embargo, en el análisis pareado se observó que en las muestras de tumores tienen un mayor número de copias del ADNmt que en sangre periférica ( $p= 0.0001$ ). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los estadios clínicos o subtipos IHQ del tumor. **Conclusiones:** Nuestros resultados sugieren que variaciones en el número de copias de ADNmt en sangre periférica pueden estar asociados a la susceptibilidad de padecer cáncer de mama; sin embargo, se requieren estudios de validación a gran escala para confirmar estos hallazgos.

## ABSTRACT

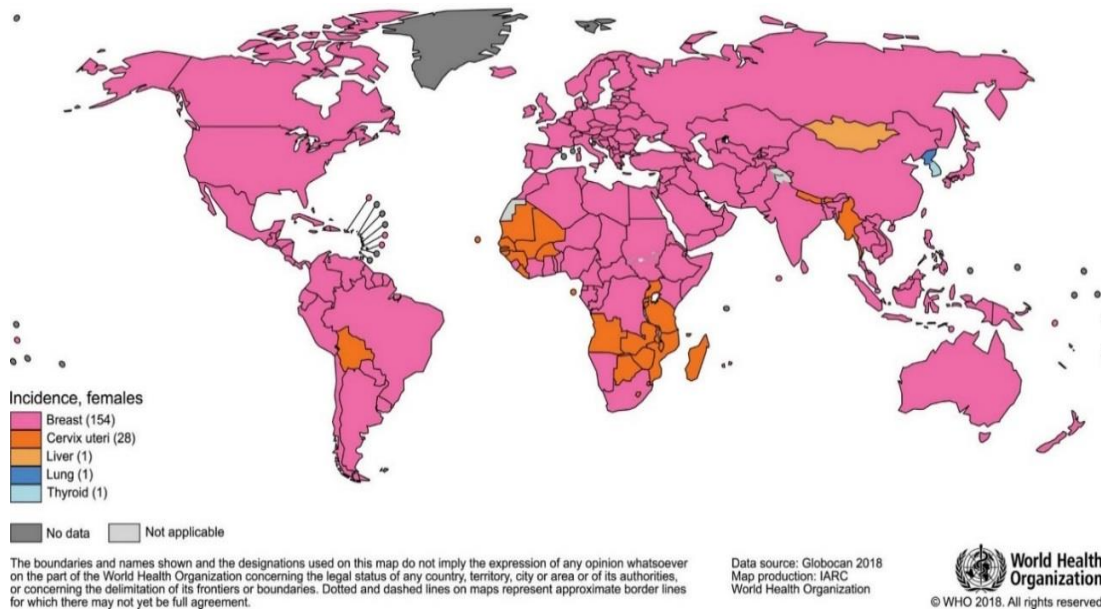
---

**Introduction:** Since 2006, breast cancer has been the main cause of death from cancer in Mexican women regardless of their socioeconomic status. Estimations in Mexico for the year 2020 are 16,500 new cases, of which only 10% will be identified in an early stage, in this sense, mitochondrial genome (mtDNA) is emerging as an important source of information for the identification of risk and prognostic biomarkers in various human diseases, including breast cancer. **Objective:** To identify variations in the number of copies of the mitochondrial genome associated with the susceptibility of breast cancer. **Method:** A case-control study was performed including paired peripheral blood-tumor samples from breast cancer patients diagnosed in Fundación del Cáncer de Mama (FUCAM), also we included, peripheral blood samples from healthy women as a control group. Using immunohistochemical markers (IHQ), the tumors were classified in luminal A (LA), luminal B (LB), HER2, triple negative (TN). The *HBB* nuclear gene and mitochondrial *ND1* gene were used to quantify the number of mtDNA copies, the quantification of the number of copies was done through quantitative real-time PCR. The statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test. **Results:** 66 patients and 63 controls were included with a mean age of 53.8 years old (SD =  $\pm$  11). The classification of the tumors using IHQ markers, we found that 62.12% were LA, 15.15% LB, 13.8% HER2 and 4.55% TN. The analysis of the number of copies in peripheral blood showed a significantly lower number of copies in affected women compared to healthy women ( $p= 0.0001$ ). Nevertheless, it was observed that the tumors have a greater number of copies of mtDNA than in peripheral blood ( $p= 0.0001$ ). No statistically significant differences were found in the clinical stages or IHQ subtypes of the tumor. **Conclusions:** Our results suggest that mtDNA levels in peripheral blood samples of breast cancer patients may be associated with susceptibility to breast cancer. However, validation in a larger sample size is required to confirm these findings.

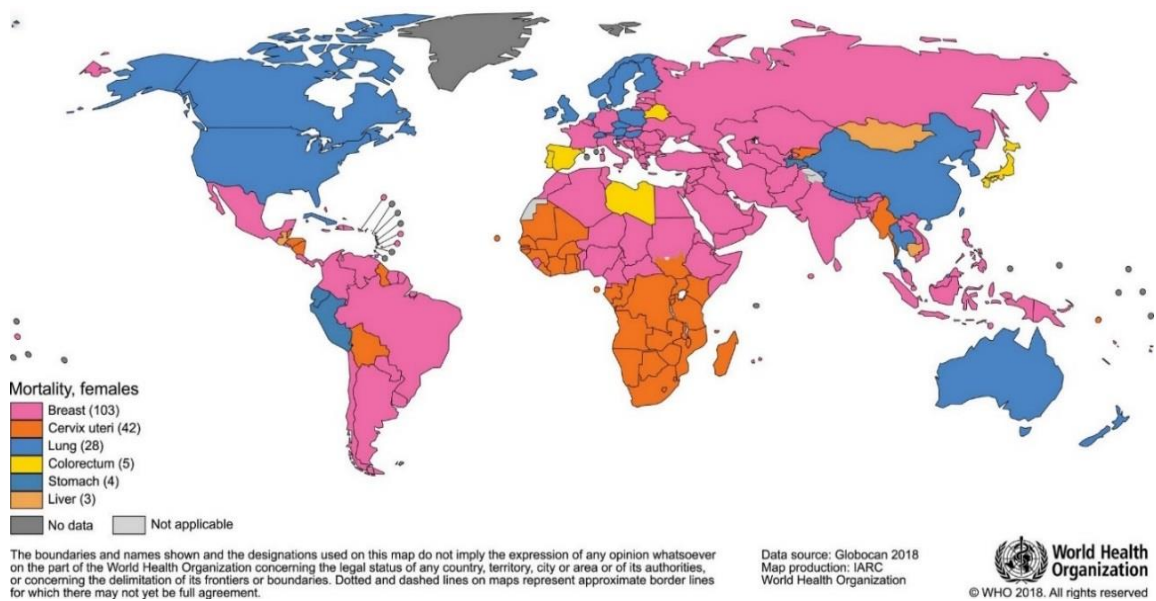
## INTRODUCCIÓN

### Epidemiología del cáncer de mama en el mundo y en México

A nivel mundial, el cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer más común y no sólo es el más frecuente en mujeres (Fig. 1), también es la principal causa de muerte por padecimientos oncológicos en la población femenina (Fig. 2). En 2018, en el mundo se diagnosticaron 2,088,849 nuevos casos con una edad estandarizada de 46.3 años.



**Figura 1. Incidencia mundial de cáncer en población femenina.** Se observan los tipos de neoplasias con mayor número de casos nuevos diagnosticados en mujeres en cada país durante el 2018. El cáncer de mama es la neoplasia que presenta mayor incidencia en la mayoría de los países (154 países) seguido del cáncer cérvico-uterino (28 países), cáncer de hígado (1 país), cáncer de pulmón (1 país) y cáncer de tiroides (1 país). Tomado de Bray et al. (2018).



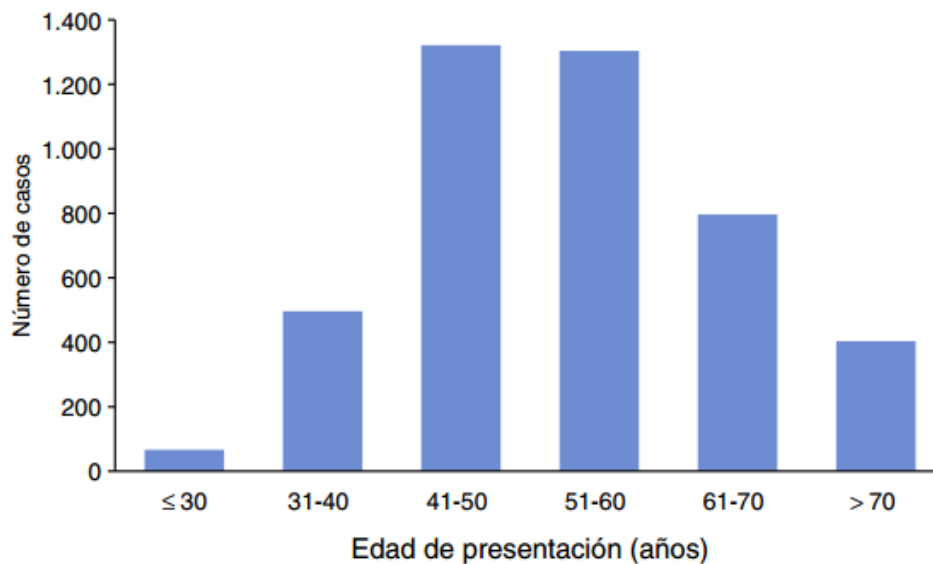
**Figura 2. Mortalidad por cáncer en población femenina a nivel mundial.** En el mapa se muestran los tipos de neoplasias que provocaron el mayor número de muertes en mujeres en una región específica durante el 2018. El cáncer de mama es la neoplasia con mayor mortalidad en la mayoría de los países (103 países) seguido del cáncer cérvico-uterino (42 países), cáncer de pulmón (28 países), cáncer colorrectal (5 países), cáncer de estómago (5 países) e hígado (3 países). Tomado de Bray et al. (2018).

La incidencia de esta enfermedad es variable en las diferentes regiones del mundo. En 2018, los países con un índice de desarrollo humano (IDH) elevado tuvieron una incidencia mayor que lo países con un IDH menor; sin embargo, la tasa de mortalidad fue mayor en estos últimos. Las regiones con una mayor incidencia fueron: Nueva Zelanda/Australia, norte, occidente y sur de Europa y Norteamérica en donde se calcularon 321.2 casos por cada 100,000 mujeres; mientras que en Sudamérica se calcularon entre 116.8 y 179.7 casos por cada 100,000 mujeres en el año 2018 (Bray et al., 2018).

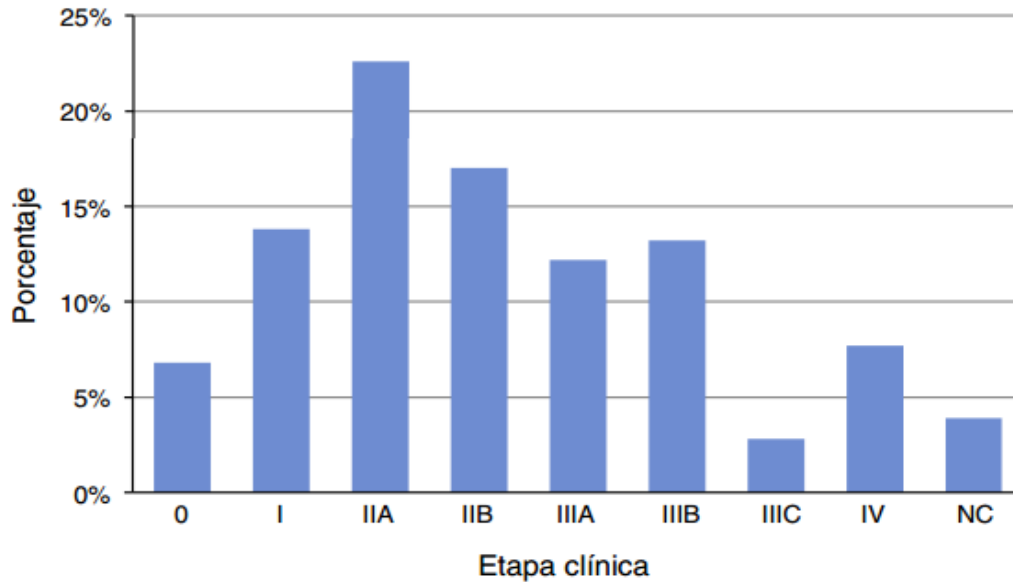
En México, el cáncer de mama es considerado un grave problema de salud pública, ya que es el cáncer más frecuente desde 2006. Presenta una incidencia de 26.6 casos por cada 100,000 mujeres mayores de 20 años, la cual se incrementa anualmente. Así mismo, tiene una alta tasa de mortalidad, en 2016, se registraron 16 defunciones por cada 100,000 (*“Estadísticas a propósito del... día mundial contra*

el cáncer (4 de febrero)” *Datos Nacionales.*, 2018). En México y otros países de Latinoamérica, la edad de presentación de la enfermedad es en promedio 10 años antes que en países desarrollados; donde la media de presentación es a los 51 años y en países de Europa y en Estados Unidos se presenta en promedio a los 63 años (Fig. 3) (Maffuz-Aziz, Labastida-Almendaro, Espejo-Fonseca, & Rodriguez-Cuevas, 2017). Las estimaciones en México para el año 2020 es de 16,500 nuevos casos, de los cuales, sólo 10% de ellos se identificarán en etapas tempranas (Knaul et al., 2009).

Un estudio realizado en pacientes con diagnóstico histopatológico confirmado de cáncer de mama atendidos en la Fundación de Cáncer de Mama (FUCAM) del primero de junio del 2005 al 31 de mayo de 2014, reportó que la edad promedio al momento del diagnóstico de las pacientes mexicanas es de 53.7 años ( $DE = \pm 12.2$  años), siendo el grupo de 41 a 50 años de edad con mayor número de casos y con un diagnóstico tardío (Fig. 4) (Maffuz-Aziz et al., 2017).



**Figura 3. Distribución de la edad de presentación de cáncer de mama en una población de pacientes atendidos en la FUCAM.** Se observa que el mayor número de casos presentados de cáncer de mama suceden entre los grupos de 41-60 años y la menor proporción de casos se presenta en menores de 30 años en mujeres mexicanas. Tomado de Maffuz-Aziz et al. (2017).



**Figura 4. Distribución de la etapa clínica de diagnóstico de cáncer de mama en una población de pacientes atendidos en la FUCAM.** Se observa que el mayor número de casos de cáncer de mama se detectan en la etapa clínica IIA. Tomado de Maffuz-Aziz et al. (2017).

## Cáncer de mama

### *Definición y etiología*

El cáncer de mama es una enfermedad derivada de la acumulación de alteraciones en el genoma de las células de la glándula mamaria que provocan un crecimiento descontrolado de células anormales que eventualmente pueden invadir los tejidos circundantes o diseminarse a otras áreas del cuerpo. Este se puede generar en las células de los lobulillos (glándulas que producen la leche), en las células de los conductos (vías que transportan la leche de las glándulas al pezón) o en los tejidos estromales (tejido conjuntivo graso y fibroso de la mama) (Girish, Vijayalakshmi, Mentham, Rao, & Nama, 2014).

Es considerada una enfermedad multifactorial debido a que es provocada por la interacción de factores ambientales y genéticos. Algunos de los factores ambientales relacionados con esta enfermedad son la dieta, el consumo del alcohol y el tabaco, exposición a agentes infecciosos, menarca temprana, menopausia



tardía; nuliparidad, envejecimiento, densidad mamaria, obesidad, sedentarismo, tratamientos hormonales y presencia de partículas contaminantes en el ambiente (Libson & Lippman, 2014).

### ***Diagnóstico clínico***

El cáncer de mama en etapas iniciales en su mayoría es asintomático por lo que la forma de ser detectado es a través de estudios de imagen como mastografía, ultrasonido, resonancia magnética y tomografía (Cárdenas-Sánchez et al., 2019). La determinación del estadio de tumor se basa en el tamaño del tumor T, la presencia de metástasis ganglionares axilares N, y la presencia de metástasis a distancia M: sistema TNM. Con base en la extensión de la enfermedad, ésta se clasifica en: etapa 0 carcinoma *in situ*, estadios I y IA (etapa inicial), estadios IIB, IIIA, IIIB, y IIIC (etapas localmente avanzadas) y el estadio IV cuando el tumor ya presenta metástasis (invasión a otros tejidos) (Cárdenas-Sánchez et al., 2019; Libson & Lippman, 2014).

### ***Clasificación inmunohistoquímica y molecular***

En la actualidad, el uso de perfiles de expresión génica es considerada una mejor herramienta en la clasificación de los subtipos del cáncer de mama, en el cual se han identificado cuatro subtipos: luminal, basal, HER2 y parecido al normal, los cuales son biomarcadores pronósticos y predictivos fundamentales que proporcionan información valiosa para una mejor elegibilidad de una terapia dirigida, además, nos permite un mejor conocimiento de la biología de la enfermedad, sin embargo, el acceso a este tipo de tecnología aun es limitada por los costos y un complejo análisis de datos bioinformáticos, es por ello que, en la práctica, se recurre a técnicas como la inmunohistoquímica (Perou et al., 2000; Provenzano, Ulaner, & Chin, 2018).

La prueba inmunohistoquímica se utiliza para identificar proteínas intracelulares reconocidas como biomarcadores que caracterizan algún tipo de tumor en diferentes tejidos, en el cáncer de mama permite investigar factores pronósticos y proporcionar predicciones (Cárdenas-Sánchez et al., 2019; Umemura & Osamura,

2004; Zaha, 2014). Entre estas pruebas existe aproximación en la clasificación de los subtipos del cáncer de mama, en el caso de la inmunohistoquímica se emplean principalmente biomarcadores como el receptor de estrógenos (RE), el receptor de progesterona (RP) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), estos determinan los subtipos luminal A, luminal B, HER2 y triple negativo (TN), este último por resultar negativo a los biomarcadores. De acuerdo con el Consenso Mexicano Sobre Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer Mamario de 2019, el cual es una guía de referencia para oncólogos y otros médicos de especialidades afines en México, también se incluyen biomarcadores como el índice de proliferación celular (Ki67) para diferenciar entre subtipo luminal A y luminal B, citoqueratinas basales (ck5/6, ck14 y ck17), factor de crecimiento epidérmico (EGFR), P53, receptores de andrógenos (*AR*) y *PDL1* para diferenciar entre la subclasificación del cáncer de mama triple negativo: a) HER2/neu enriquecido, fenotipo basal y bajos en claudina y b) basal 1, basal2, mesenquimal y mesenquimal células madres, inmunomodulador y luminal asociado a andrógenos (Cárdenas-Sánchez et al., 2019; Perou et al., 2000; Provenzano et al., 2018; Turashvili & Brogi, 2017; Vuong, Simpson, Green, Cummings, & Lakhani, 2014).

Los subtipos luminales A y B son los que tienen mejor pronóstico, al expresar receptores de estrógenos pueden ser tratados con tamoxifeno o inhibidores de la aromatasa, pero tienen baja respuesta a terapia neoadyuvante. El subtipo HER2 se asocia a un mal pronóstico, tiene buena respuesta a la quimioterapia y aproximadamente el 50% de los casos responde al tratamiento con trastuzumab. El cáncer de mama triple negativo no tiene una terapia dirigida específicamente para ser tratada, y el tratamiento de elección es la quimioterapia, se considera que tiene el peor pronóstico (Irigoyen et al., 2011; Winters, Martin, Murphy, & Shokar, 2017).

Aproximadamente 74% de los casos de cáncer de mama en Estados Unidos son luminales A y B, 12% de cáncer de mama triple negativo, 4% son HER2. El subtipo molecular de mayor frecuencia en población mexicana es el subtipo luminal (65.73%), seguido del subtipo triple negativo (14.63%) (Tabla 1) (Maffuz-Aziz et al., 2017; Winters et al., 2017).

**Tabla 1. Subtipos del cáncer de mama aproximación por IHQ**

<b>Subtipo</b>	<b>Estatus RE</b>	<b>Estatus RP</b>	<b>Estatus HER2</b>	<b>Estatus Ki67</b>	<b>Frecuencia población mexicana</b>	<b>Pronóstico</b>
<b>Luminal A</b>	ER+	>20%	HER2-	<20%	65.7%	Bueno
<b>Luminal B</b>	ER+	<20%	HER2-/+	>20%	10.9%	Bueno
<b>HER2</b>	ER+	RP-	HER2+		8.7%	Malo, tratamiento dirigido.
<b>Triple negativo</b>	ER-	RP-	HER2-		14.6%	Malo, no tiene tratamiento dirigido.

RE: Receptor de estrógeno; RP: Receptor de progesterona; HER2: Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2; Ki67: índice de proliferación celular. Información adaptada de Maffuz-Aziz et al. (2017) y Cárdenas-Sánchez et al. (2019).

### ***Bases genéticas del cáncer de mama***

Los estudios genómicos del cáncer de mama han arrojado una gran cantidad de información respecto de factores genéticos asociados a la enfermedad, dichos estudios genómicos se han visto beneficiados con el avance y desarrollo de nuevas tecnologías para la caracterización de mutaciones en el genoma que generalmente se enfocaban en los exones que codificaban proteínas, sin embargo, en la actualidad también se estudian regiones no codificantes del genoma (intrónicas e intergénicas) (Nik-Zainal et al., 2016).

Algunos de los principales factores asociados al cáncer de mama son reordenamientos cromosómicos, mutaciones y cambios epigenéticos como la hipermetilación del promotor resultando en la activación de genes promotores del crecimiento (oncogenes) o la supresión de genes inhibidores del crecimiento (genes supresores de tumor como *p16INK4A* y *RASSF1A*), cambios en el número de copias

y en los perfiles de expresión global de diversos genes, los cuales también han incrementado el conocimiento y entendimiento de los mecanismos involucrados en este proceso neoplásico. Al igual que la mayoría de las neoplasias, las alteraciones en el genoma pueden ser hereditarias y/o adquiridas (Provenzano et al., 2018; Turashvili & Brogi, 2017).

Dos de los genes principalmente asociados con este tipo de cáncer son los genes *BRCA1* y *BRCA2*, involucrados en la reparación del daño celular y mantenimiento del crecimiento normal de las células. Los tumores generados por mutaciones en los genes *BRCA1*, suelen ser del subtipo molecular basal o triple negativo por no expresar RE, RP y HER2 y es considerado el más agresivo. Las mutaciones en el gen *BRCA2* regularmente corresponden a tumores esporádicos, mutaciones en estos genes se encuentran aproximadamente en el 15% de los casos de cáncer de mama (Sheikh et al., 2015; Shiovitz & Korde, 2015).

Otros genes mutados asociados al desarrollo del cáncer de mama son: *PTEN* (presente en cerca del 10% de los casos), *TP53* (gen supresor de tumores que debido a mutaciones en él puede resultar en un subtipo de cáncer de mama triple negativo y está presente en aproximadamente 40% de los cánceres de mama adquiridos), *CDH1* (cumple un papel crítico en la arquitectura normal de la célula, mantenimiento de la integridad de los tejidos y función de los tejidos epiteliales y se considera un supresor tumoral), *AR* (se ha asociado un incremento en el número de repeticiones de CAG en esta región que aumenta el riesgo de cáncer de mama), *CHEK2* (supresor de tumor), *BRIP1* (supresor de tumor, mantiene la estabilidad de la información genética de la célula), *PALB2* (evita que se acumulen mutaciones), *ATM* (este gen da instrucciones para hacer una proteína que ayuda a controlar la tasa de división y crecimiento celular) y *STK11/LKB1* (genes supresores de tumores, mutaciones en estos genes pueden inducir al cáncer de mama en individuos susceptibles que presentan el síndrome de Peutz-Jeghers), *PPP2R2A* (se encontró una disfunción específica del gen en el subtipo luminal B), *MTAP* y *MAP2K4* (muestran deleciones homocigotas y heterocigotas) (Libson & Lippman, 2014; Sheikh et al., 2015; Shiovitz & Korde, 2015).

Además, las variantes genómicas se pueden considerar que actúan en *cis* cuando una variante tiene impacto en su propia expresión y *trans* cuando la variante es asociada con genes en otros sitios del genoma, por ejemplo la delección del cromosoma 5 asociada a la programación del ciclo celular en los cánceres del tipo basal (Curtis et al., 2012).

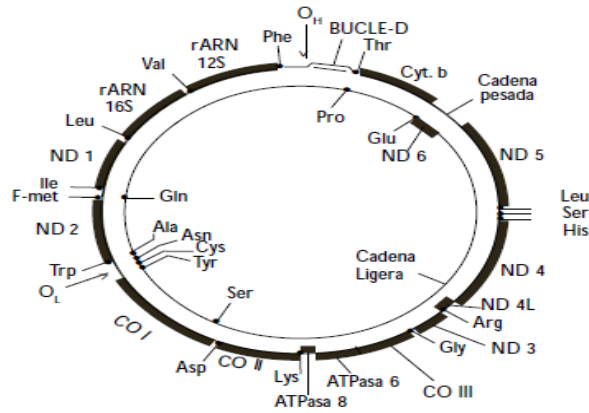
Por otro lado, se han estudiado alteraciones en el genoma mitocondrial incluyendo polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), mutaciones puntuales, inserciones y deleciones, las cuales, junto con las variaciones en el número de copias se han observado asociaciones con el cáncer de mama (Chinnery, 1993).

Estas alteraciones pueden afectar muchos de los procesos y funciones como vías de señalización, inmunidad antitumoral, senescencia celular, migración y metástasis, angiogénesis, respuesta al tratamiento y vías metabólicas (Turashvili & Brogi, 2017).

Sin duda, los estudios del genoma nuclear han contribuido de manera muy importante en el conocimiento de las bases genéticas del cáncer de mama, sin embargo, es fundamental continuar con el estudio de otros elementos que participan en el proceso del cáncer de mama que ayuden a explicar el universo de los casos. Con base en estos resultados, se ha optado por estudiar otros aspectos de la regulación de expresión genética tales como la transcripción del ARN, la epigenética y el genoma mitocondrial, siendo este último, un campo que ha mostrado gran relevancia en la etiología de esta patología.

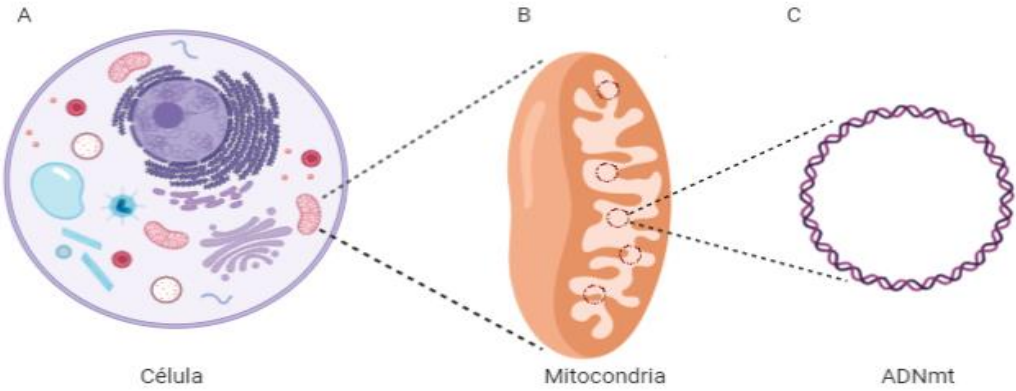
### **ADN Mitocondrial**

El ADN mitocondrial (ADNmt), es un genoma circular de doble cadena que contiene 37 genes, 13 de los cuales codifican para proteínas que son subunidades clave para la organización estructural y funcional de los complejos de la cadena respiratoria, 22 para ARN de transferencia y 2 ARN ribosomales (Fig. 5) (Chinnery, 1993).



**Figura 5. Mapa genético del ADN mitocondrial humano.** Se representa la doble cadena del ADN con la ubicación de los 37 genes que se codifican en el genoma mitocondrial. OH y OL simbolizan los orígenes de la replicación de la cadena pesada y ligera. Tomado de Solano Abelardo (2001).

El ADNmt también se caracteriza por el alto número de copias que se pueden encontrar en una célula, ya que una célula puede contener miles de mitocondrias y cada mitocondria de 2 a 10 copias de su genoma. El número de copias del ADNmt varía de  $10^2$  a  $10^4$  copias por célula y estas cantidades dependen del tipo de tejido, además se han encontrado variaciones asociadas a diversos trastornos (Fig.6) (Hu, Yao, & Shen, 2016; Xia et al., 2017).



**Figura 6. A) Célula y sus organelos.** En una célula se pueden encontrar miles de mitocondrias. **B) Mitocondria.** Cada mitocondria contiene de 2 a 10 copias de ADNmt. **C) ADNmt.** Representación de una molécula del genoma mitocondrial el cual se puede encontrar en cantidades de  $10^2$  a  $10^4$  copias por mitocondria. Figura creada con Biorender.com

Así mismo, el ADNmt también presenta una gran cantidad de variantes en su secuencia que incluyen polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), mutaciones puntuales, inserciones y deleciones, las cuales, junto con las variaciones en el número de copias se han relacionado con alteraciones en los niveles de especies reactivas de oxígeno y de la producción de ATP, contribuyendo al desarrollo del cáncer (Yadav & Chandra, 2013). Siendo las mutaciones puntuales y cambios en el número de copias las alteraciones más comunes del ADNmt en las células tumorales (Chinnery, 1993).

Mutaciones puntuales en los orígenes de replicación y los cambios en el número de copias de ADNmt pueden alterar la expresión de los genes mitocondriales y afectar procesos como la producción de energía, la transducción de la señalización, la apoptosis y el crecimiento celular. De hecho, se ha reportado que algunas de estas mutaciones están involucradas en el desarrollo de diferentes enfermedades humanas, incluyendo el cáncer de mama; algunas de estas mutaciones se encuentran con mayor recurrencia en ciertas posiciones y se ha considerado que dado estas posiciones podrían dar ventajas a las células tumorales (Hu et al., 2016; M. J. A. Weerts, Sleijfer, & Martens, 2019).

Se ha reportado que variantes del genoma mitocondrial como SNPs, inserciones/deleciones (Indel), así como variantes en el número de copias confieren riesgo para padecer la enfermedad, principalmente, variantes encontradas en el gen *MT-ATP6* (Torres, 2013) y en la región D-loop (Jimenez-Morales, Perez-Amado, Langley, & Hidalgo-Miranda, 2018). Por ejemplo, algunos de los polimorfismos reportados como asociados al riesgo de cáncer de mama en mujeres Europeo-americanas son G9055A (OR 3.03, IC 95%,  $p= 0.0004$ ), A10398G (OR 1.79, IC 95%,  $p= 0.01$ ) y T16519C (OR 1.98, IC 95%,  $p= 0.0030$ ) (Bai, Leal, Covarrubias, Liu, & Wong, 2007).

## **Genoma mitocondrial y variantes en número de copias en cáncer de mama**

Múltiples evidencias sugieren que la mitocondria tiene un papel muy importante en el desarrollo, progresión y metástasis del cáncer de mama. Por ejemplo, en 2010, un estudio realizado en 103 muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama y 103 mujeres sanas de población caucásica, observó que un incremento en el número de copias del ADNmt se asocia con mayor riesgo de padecer cáncer de mama, además este estudio fue replicado por el mismo grupo de trabajo en 2015 con 1000 pacientes y 1000 controles y observaron el mismo resultado; ese mismo año Lemnrau y colaboradores observaron la misma tendencia al evaluar 1108 pacientes caucásicas (Lemnrau et al., 2015; Shen, Platek, Mahasneh, Ambrosone, & Zhao, 2010; Shen, Wan, Song, & Zhao, 2015).

Thyagarajan et al. (2013), realizaron un estudio de casos y controles anidado en una cohorte de 63,257 mujeres, de las cuales, 183 desarrollaron cáncer de mama. Este grupo documentó que las mujeres que desarrollaron la enfermedad, mostraron un incremento en el número de copias del ADNmt, tres años antes del diagnóstico (Thyagarajan et al., 2013). Con base en estos antecedentes, propusieron que un incremento en el número de copias del ADNmt se asocia con el riesgo de cáncer de mama.

Por otro lado, estudios realizados en el 2007 en donde se estudió el ADNmt de 59 muestras pareadas tumor-tejido normal, se encontró que mutaciones entre la base 303 y 309 o mutaciones cercanas al sitio de origen de la replicación generan una disminución importante en el número de copias del genoma mitocondrial (Yu et al., 2007).

Recientemente, en el 2018 un grupo de investigadores de Estados Unidos que utilizaron muestras de sangre de mexico-americanos encontraron que el número de copias del ADNmt es mayor en los participantes que desarrollaron cáncer en comparación con las mujeres sanas, además observaron que el número de copias de los controles cambia significativamente según las características socio-demográficas (Zhao et al., 2018).



Los estudios previos apoyan la propuesta de que el número de copias de ADNmt podría ser una herramienta muy útil para el diagnóstico presintomático del cáncer de mama, como indicadores de la evolución de la enfermedad o predictores de la respuesta al tratamiento. Sin embargo, también se ha reportado que existen diferencias en el número de copias entre las poblaciones (por sus antecedentes genéticos) y que éstas pueden ser modificadas por condiciones ambientales y el tipo de alimentación. Por lo tanto, es necesario validar estos hallazgos en cada población antes de ser considerada como una herramienta útil en el diagnóstico y abordaje clínico del cáncer de mama.

## JUSTIFICACIÓN

---

A nivel mundial, el cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer más común y afecta principalmente a mujeres. En México es el cáncer más frecuente desde 2006, afectando principalmente a mujeres de entre 40 y 50 años de edad, 10 años antes que en países desarrollados.

A pesar de que se conoce que los factores genéticos juegan un rol muy importante en la etiología de esta enfermedad, aún no se conocen todos éstos y más aún su comportamiento en las diferentes poblaciones. Se ha reportado que variantes del genoma nuclear desempeñan un papel crítico en el desarrollo del cáncer de mama y ahora se sabe que el genoma mitocondrial participa de manera importante en el cáncer de mama, reflejando la necesidad de explorar la implicación de otros procesos biológicos como los realizados por la mitocondria. Este organelo participa en el proceso respiratorio de la célula a través del cual la provee de energía; además participa en procesos como: crecimiento celular, diferenciación celular, senescencia y apoptosis, es por ello que alteraciones en el genoma mitocondrial tienen gran impacto en el funcionamiento normal de la célula.

Así, el estudio del genoma mitocondrial en pacientes con cáncer de mama podría evidenciar alteraciones en factores genéticos asociados a su desarrollo que nos condujeran a la identificación de potenciales biomarcadores predictores tanto de riesgo como de respuesta al tratamiento.

## **OBJETIVOS**

---

### **Objetivo General**

- Identificar variaciones en el número de copias del genoma mitocondrial asociados a la susceptibilidad de padecer cáncer de mama.

### **Objetivos particulares**

- Evaluar el número de copias del genoma mitocondrial en sangre periférica de mujeres con cáncer de mama y de mujeres sanas.
- Conocer las diferencias en el número de copias del genoma mitocondrial entre sangre periférica y tumores de mujeres con cáncer de mama.
- Evaluar la asociación del número de copias del genoma mitocondrial con el estadio clínico de la enfermedad y el subtipo del tumor.

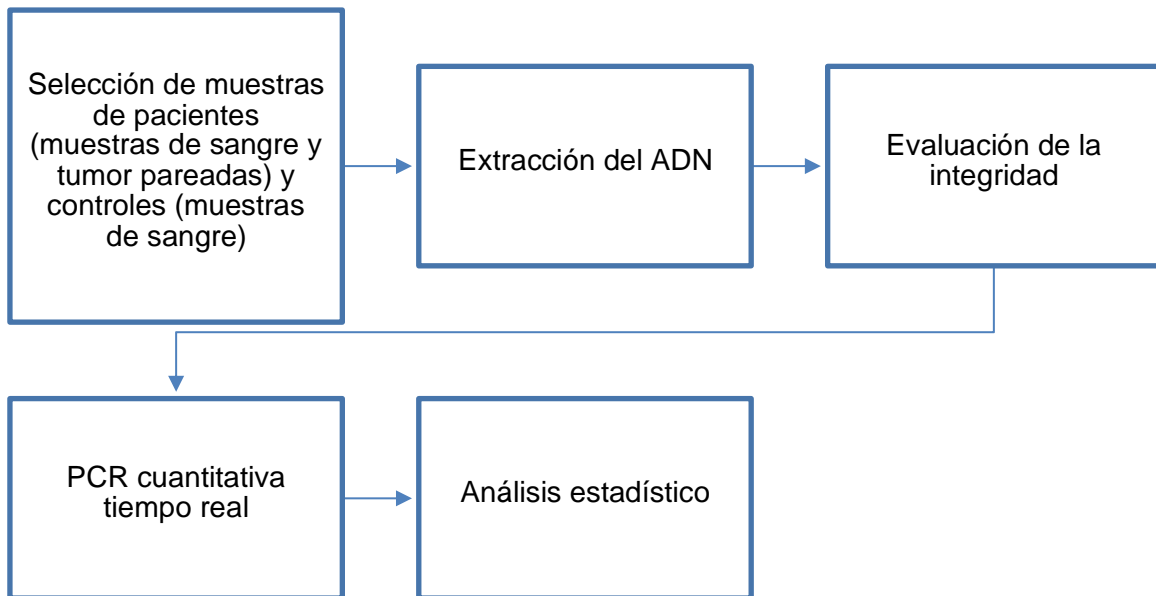
## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### Población de estudio

Se realizó un estudio caso-control (aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Medicina Genómica número CEI2016/13), en el que se incluyeron muestras de sangre periférica y de tumor de pacientes con cáncer de mama, mayores de 18 años, que aún no habían recibido tratamiento antineoplásico atendidas en la FUCAM. El diagnóstico clínico se estableció mediante mastografía y biopsia del tumor. La clasificación del tumor se realizó por inmunohistoquímica (IHQ). Sólo se incluyeron pacientes que aceptaron participar en el proyecto y firmaron la carta de consentimiento informado. Como controles se incluyeron muestras de mujeres sin cáncer de mama provenientes del biobanco del laboratorio de Genómica del Cáncer del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Las muestras con baja integridad y cantidad de ADN fueron eliminadas (Tabla 2 y Fig. 7).

**Tabla 2.** Criterios de inclusión, exclusión y eliminación de las pacientes con cáncer de mama

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	Criterios de eliminación
Mujeres mayores de 18 años	Pacientes que se retiren del estudio	Muestras con baja integridad y cantidad de ADN
Pacientes sin tratamiento antineoplásico	Pacientes que no tengan muestras pareadas de sangre y tumor	
Tumores con clasificación por IHQ		
Consentimiento informado		



**Figura 7. Estrategia general para el análisis del número de copias del genoma mitocondrial.**

### **Obtención de la muestra de sangre periférica y del tumor**

Las muestras de sangre periférica, de las pacientes y los controles, se obtuvieron por venopunción a través del sistema Vacutainer. Los tubos de sangre se centrifugaron a 2500 rpm para separar el plasma y el paquete de células leucocitarias, las cuales se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extracción de ácidos nucleicos.

Las muestras de tejido tumoral se obtuvieron al momento de la resección quirúrgica del tumor. En el área de patología se seleccionaron las zonas con alto contenido tumoral. El tumor fue dividido en dos partes, una parte fue congelada con nitrógeno líquido y almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ ; la segunda se fijó en formol para su inclusión en parafina. De la muestra incluida en parafina, se realizaron cortes de  $3\ \mu\text{m}$  con un microtomo. Los cortes histológicos se tiñeron con hematoxilina-eosina para determinar el porcentaje de células tumorales. Las muestras de tumor que

presentaron un contenido de células tumorales mayor al 80% fueron seleccionadas para el estudio.

## **Extracción de ácidos nucleicos**

### ***Sangre periférica***

Para la extracción de los ácidos nucleicos a partir de sangre periférica, se utilizó el Maxikit de Qiagen, siguiendo las especificaciones del proveedor. Brevemente, los paquetes leucocitarios se resuspendieron con 500 µL de proteasa en un tubo Falcon de 50 mL y el volumen fue ajustado a 5 mL con PBS 1X. Se añadieron 6 mL de Buffer AL, se mezcló vigorosamente y se incubó a 70°C por 10 minutos. Posteriormente se añadieron 5 mL de etanol absoluto y la mezcla fue transferida a la columna QIAmp Maxi que se centrifugó a 3000 rpm por 3 minutos. Se descartó el filtrado y los lavados fueron realizados añadiendo 5 mL de Buffer AW1 y centrifugando a 5000 rpm por 1 minuto. Posteriormente se añadieron 5 mL de Buffer AW2 y se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos. La columna fue transferida a un tubo nuevo, se añadieron 500µL de Buffer TE y se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos.

### ***Tejido tumoral***

El ADN de tejido tumoral se extrajo usando el AllPrep DNA/RNA MiniKit (Qiagen). Las muestras de tejido fresco fueron homogenizadas usando el TissueRuptor y 600 µL de buffer de lisis (RLT), posteriormente el homogeneizado se centrifugó por 3 minutos a 14000 rpm. El sobrenadante se transfirió a una columna All Prep ADN, la cual se centrifugó por 30 segundos a 10000 rpm. Se descartó el eluyente y la columna se transfirió a un nuevo tubo de recolección. Se adicionaron 500 µL de buffer AW1, se centrifugó durante 15 segundos a 10000 rpm y se descartó el filtrado. Enseguida, a la columna se le adicionaron 500 µL de buffer AW2 y se centrifugó durante 2 minutos a 14000 rpm. Finalmente, la columna fue transferida a otro tubo Eppendorf de recolección y se adicionaron 100 µL de buffer TE sobre la membrana, se incubó a temperatura ambiente por un minuto y se centrifugó 1 minuto a 10000 rpm.

## **Evaluación de la pureza y de la integridad del ADN**

Las muestras de ADN fueron cuantificadas mediante espectrofotometría en un NanoDrop ND-1000 y su integridad fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con SYBRGold.

## **Evaluación de número de copias mediante PCR en tiempo real**

El número de copias de ADN mitocondrial se cuantificó por PCR en tiempo real (PCR-TR) (QuantStudio™ 5 Applied Biosystems).

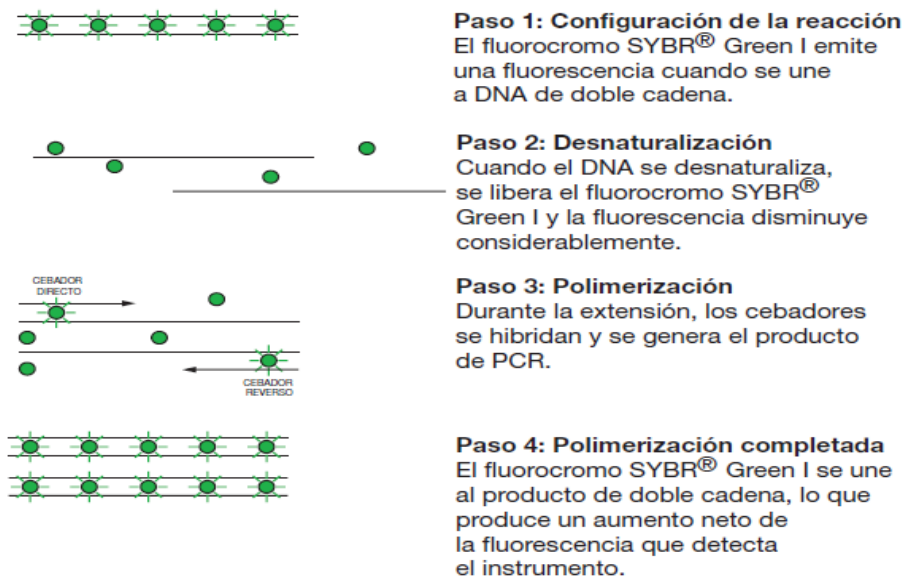
### ***PCR cuantitativa en tiempo real***

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR) es una técnica refinada de la original Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) desarrollada por Kary Mullis y colaboradores en la década de los 80's en donde una secuencia de ADN es amplificada en un proceso cíclico para generar una gran cantidad de copias idénticas que pueden ser analizadas y cuantificadas. La reacción se inicia con un incremento de la temperatura para la desnaturalización del ADN, se requiere de una temperatura de 95°C para desestabilizar las uniones de los enlaces de hidrógeno que mantienen juntas las 2 cadenas del ADN, posteriormente baja la temperatura y se lleva a cabo la alineación de los oligonucleótidos (la temperatura ideal en esta etapa depende de cada diseño del oligonucleótido) y finalmente la temperatura se establece a los 72°C, temperatura óptima para que la polimerasa inicie la extensión de los oligonucleótidos. En la PCR-TR además se incluye un fluorocromo que se intercala entre las hebras de ADN y emite fluorescencia cuando estas forman una doble cadena, de esta forma, esta técnica permite la amplificación del ADN y su detección (Gadkar & Fillion, 2014; Ghannam & Varacallo, 2019; Kubista et al., 2006).

En los experimentos de cuantificación en tiempo real, las reacciones se caracterizan por el punto en el que la amplificación de un producto de PCR logra un nivel fijo de fluorescencia. Las gráficas de amplificación muestran la fluorescencia detectada en

el número de ciclos que se han realizado. En los primeros ciclos de la PCR, no hay ningún cambio significativo en la señal de fluorescencia. Este rango predefinido de ciclos de PCR se denomina línea basal. En primer lugar, el software genera una gráfica de amplificación en la que se ha sustraído la línea basal. Para ello, calcula una tendencia matemática de la señal del notificador fluorocromo normalizado (valores  $R_n$  correspondientes a los ciclos de la línea basal). A continuación, un algoritmo busca el punto de la gráfica de amplificación en el que la señal del notificador fluorescente normalizado con la línea basal corregida [valor delta  $R_n$  ( $\Delta R_n$ )] cruza el umbral. El ciclo en el que el valor  $\Delta R_n$  cruza el umbral se define como  $C_t$ .

En la PCR-TR se pueden utilizar diferentes marcadores fluorescentes para visualizar en directo el perfil del producto de amplificación, en este estudio usamos SYBR® GREEN que son pequeñas moléculas que al intercalarse en el DNA emiten fluorescencia (Fig. 8) ("Guía de reactivos Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR Systems," 2010).



**Figura 8. Fundamento de la PCR cuantitativa en tiempo real.** Uso del intercalante SYBR® GREEN. Tomado de la Guía de reactivos Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR Systems. 2010.

### **Diseño de oligonucleótidos**

Para el ensayo se utilizaron un par de oligonucleótidos específicos para el gen nuclear *HBB* (hemoglobina subunidad beta) y para el gen mitocondrial *ND1-MT* (NADH deshidrogenasa 1) los cuales fueron previamente reportados por Huang y colaboradores en 2016; para el ADN mitocondrial del gen *ND1-MT*: 5'GACGCCATAAACTCTTCACCAA, 5'AGGTTGAGGTTGACCAGGGG y un par de oligonucleótidos para el análisis de un gen nuclear *HBB*: 5'CTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACT, 5'AGGCCATCACTAAAGGCACCGAGC (Huang et al., 2016).

### **Curva estándar**

Se incluyó una curva estándar en cada placa, una curva para el gen nuclear y una para el gen mitocondrial, con las siguientes diluciones de un ADN control: 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25 y 50 ng/μl, con una linealidad mínima de  $r^2 = 0.99$ . Además, se calculó la eficiencia para cada conjunto de oligonucleótidos con la siguiente ecuación:  $E = (10^{(-1/N^2)}) - 1$ .

Dónde:

E= Eficiencia

N= Pendiente de la curva estándar

### **Condiciones de la PCR**

En la preparación de cada muestra el volumen final fue de 10 μL en donde se incluyeron 10 ng/μl de ADN total, 100 ng/μl de cada oligonucleótido, 2.5 μL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) y 4.5 μl de agua. El programa de termociclado consistió en un ciclo de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 62.0°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto. Se realizó el análisis por triplicado para cada muestra y se incluyeron controles negativos.



### **Análisis del número de copias del genoma mitocondrial**

Se realizó el cálculo del número de copias del genoma mitocondrial con la siguiente fórmula:  $2e^{([A]Ct^*EA)-[B]Ct^*EB)}$ , en donde:

**e:** función exponencial

**A:** Promedio de los Ct (Threshold cycle o ciclo umbral) del gen nuclear *HBB*

**B:** Promedio de los Ct (Threshold cycle o ciclo umbral) del gen mitocondrial *ND1*

**Ct:** Ciclo umbral (Threshold cycle o ciclo umbral) determinado por el equipo

**E:** Eficiencia de los genes *HBB* y *ND1*

La eficiencia de la reacción de PCR en tiempo real es calculada por el equipo a partir de la curva estándar que se preparó e incluyó en cada placa de PCR. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

El cálculo del número de copias del ADNmt se expresa en unidades arbitrarias (McDermott et al., 2018).

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó con la prueba U de Mann-Whitney para la comparación de 2 grupos independientes para datos con distribución no normales y se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis cuando se compararon más de 2 grupos. Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

### Características de la población de estudio

En el estudio se incluyeron 195 muestras que forman parte del banco de DNA del Laboratorio de Genómica del Cáncer del Instituto Nacional de Medicina Genómica, mismas que fueron colectadas de agosto de 2016 a diciembre de 2017. Sesenta y seis fueron muestras pareadas de sangre periférica y tumor de mujeres con cáncer de mama y 63 de controles sanos. Las pacientes se distribuyeron en un rango de 35 a 80 años de edad, con un promedio de 53.8 y desviación estándar (DE) de  $\pm 11$  años de edad. Del total de las muestras de tumores, en 56 se estableció el subtipo por inmunohistoquímica, siendo el más frecuente el luminal A en el 41 (62.12%) casos, seguido del luminal B en 10 (15.15%), el triple negativo en 3 (4.55%) y el menos frecuente el HER2 en 2 pacientes (3.03%) (Tabla 3). El estadio clínico que se observó con mayor frecuencia fue el IIA con 41 pacientes (62.12%), seguido del IIB en 12 pacientes (18.18%) (Tabla 4).

**Tabla 3.** Distribución de subtipos inmunohistoquímicos de cáncer de mama

Clasificación	n	%
Luminal A	41	62.12
Luminal B	10	15.15
Her2+	2	13.8
Triple negativo	3	4.55
No determinado	10	15.15

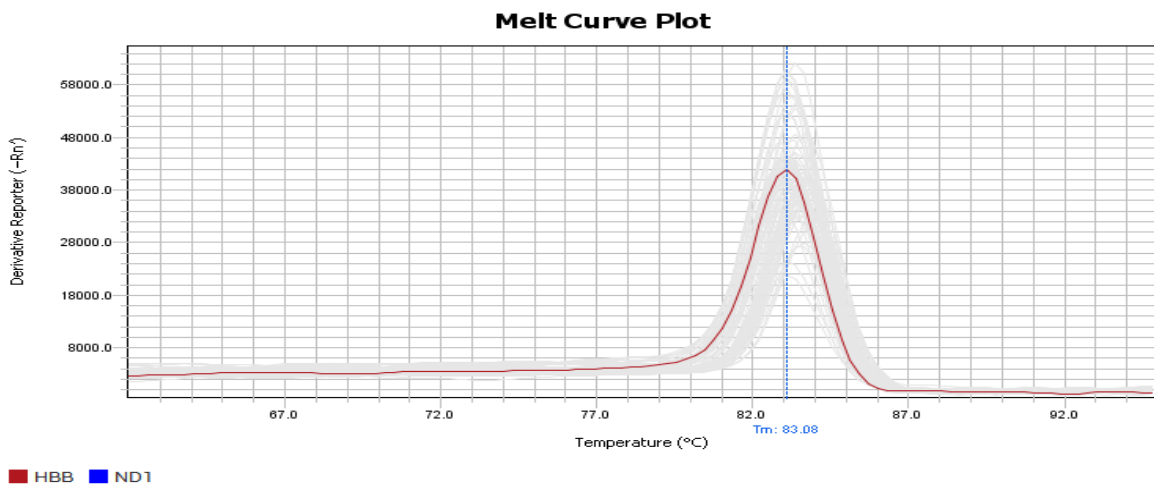
**Tabla 4.** Distribución de casos por estadio clínico

Clasificación	n	%
0	3	4.55
I	5	7.58
IIA	41	62.12
IIB	12	18.18
IIIC	2	3.03
No determinado	3	4.55

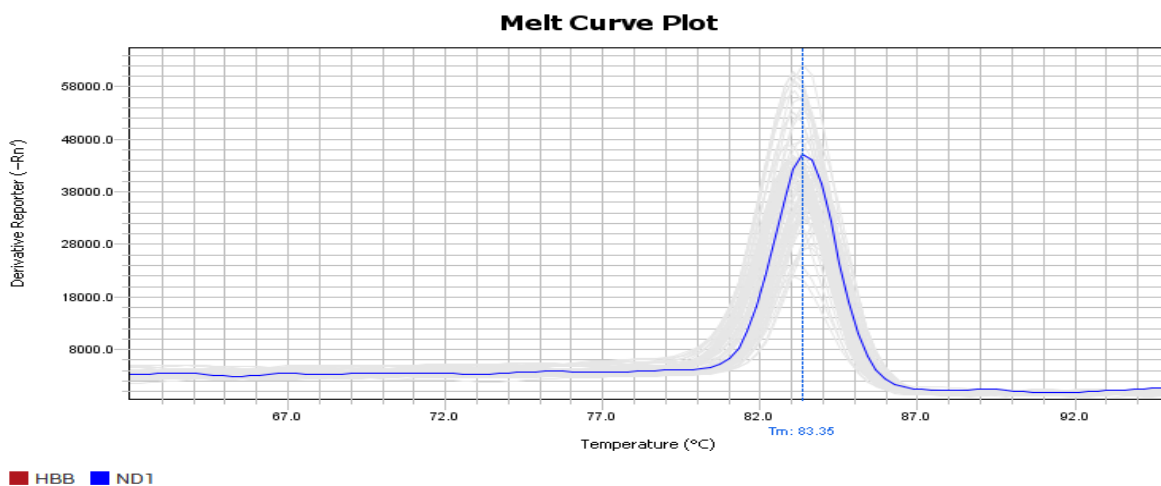
## Selección de oligonucleótidos y curva de disociación

Para determinar la especificidad de amplificación se realizó una curva de disociación para los oligonucleótidos del gen nuclear *HBB* y del gen mitocondrial *ND1*. En ambos casos, los picos de disociación indican que no se generaron productos de amplificación inespecíficos (Fig. 9).

A)



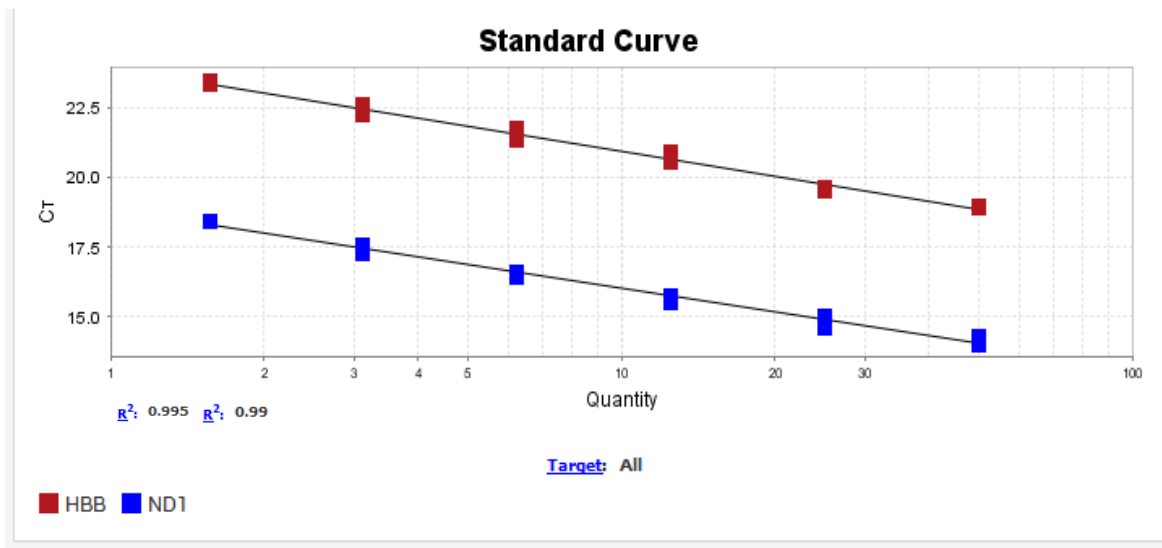
B)



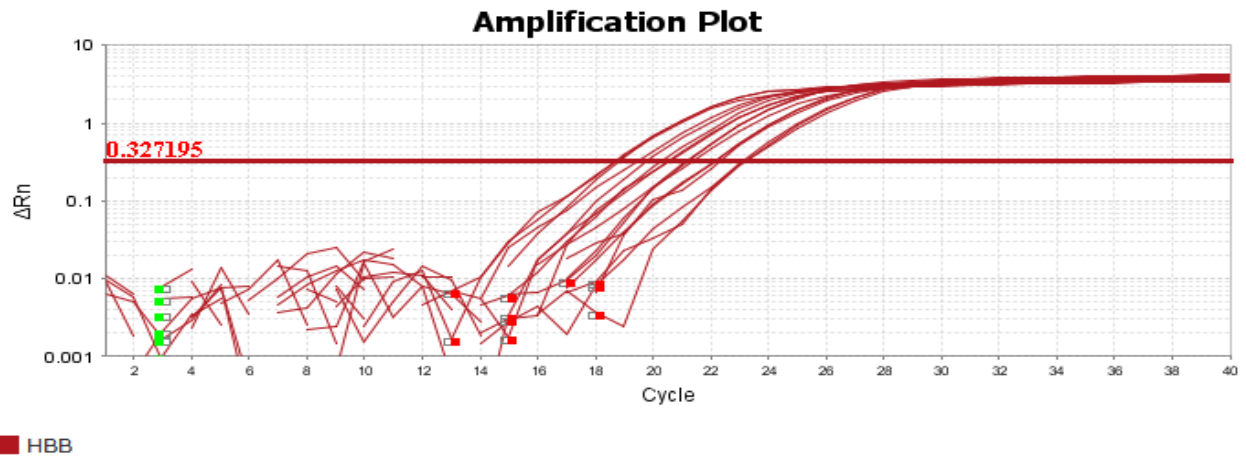
**Figura 9. Gráfica de la curva de disociación para los genes utilizados en el estudio. A) gen nuclear *HBB*; B) gen mitocondrial *ND1*.**

## Curva estándar

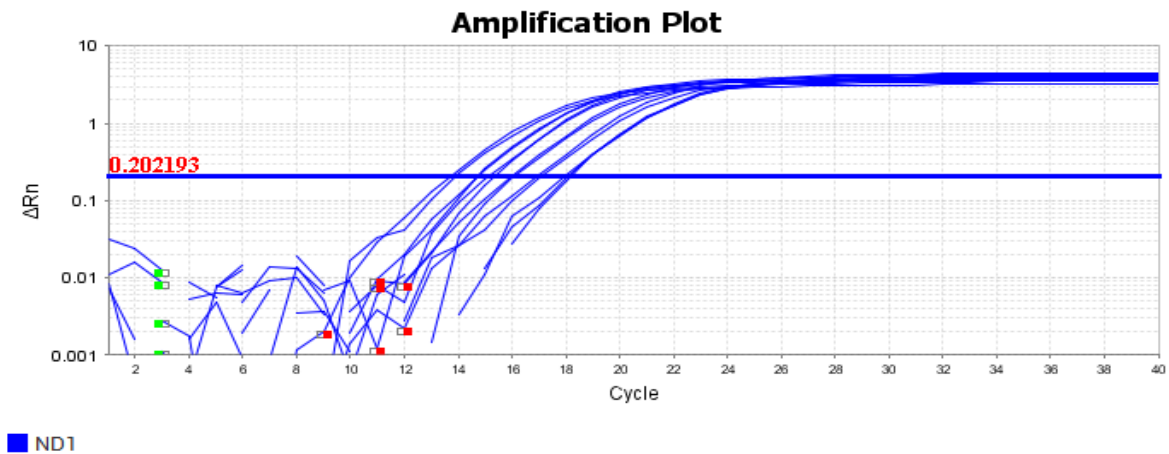
Para determinar la eficiencia de amplificación de cada gen, se realizaron curvas estándar en cada placa donde se realizó el análisis de las muestras para asegurar que se cumplieran con los parámetros de linealidad en cada ensayo. Para estos ensayos se manejaron concentraciones de 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25 y 50 ng/ $\mu$ l y se observó una  $R^2= 0.995$  para el gen nuclear *HBB* y  $R^2= 0.99$  para el gen mitocondrial *ND1*. Todos los ensayos se realizaron por triplicado (Figs. 10, 11 y 12).



**Figura 10. Gráfica de las curvas estándar de los genes *HBB* y *ND1*.** Se representa el Ct obtenido para cada punto de la curva y las concentraciones de la curva estándar (1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25 y 50 ng/ $\mu$ l), se obtuvo una  $R^2$  para el gen *HBB* de 0.995 y una  $R^2$  para el gen *ND1* de 0.99.



**Figura 11. Gráfica de amplificación para el gen *HBB*.** Se observa el Rn obtenido para cada punto de la curva y el Ct de la curva estándar (1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25 y 50 ng/μl). (Ct: threshold cycle o ciclo umbral).



**Figura 12. Gráfica de amplificación para el gen *ND1*.** Se observa el Rn obtenido para cada punto de la curva y el Ct de la curva estándar (1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25 y 50 ng/μl). (Ct: threshold cycle o ciclo umbral).

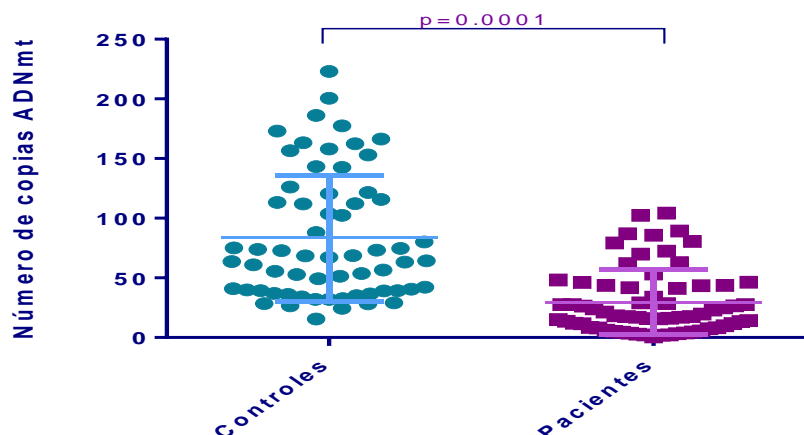
### Número de copias del genoma mitocondrial en sangre periférica.

El estudio caso-control en el que se analizaron 63 muestras de mujeres sanas y 66 muestras de pacientes con cáncer de mama, se observó que el rango del número de copias del ADNmt en mujeres sanas fue de 15.5. a 223.1 con un promedio de 83.4 (DE=  $\pm$  52.8). Mientras que en las pacientes se detectaron en un rango de 0.4 a 104.3 con un promedio de 29.7 (DE=  $\pm$  27.3) (Tabla 5). Al comparar los valores documentados entre ambos grupos, las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p= 0.0001$ , prueba U de Mann-Whitney) (Fig. 13).

**Tabla 5.** Número de copias del ADNmt en sangre periférica

Tejido	Población	N	Número de copias del ADNmt				p
			X	DE	Min	Max	
Sangre	Controles	63	83.4	52.8	15.5	223.1	0.0001
	Pacientes	66	29.7	27.3	0.4	104.3	

X: Promedio, DE: Desviación estándar, Min: Valor mínimo, Max: Valor máximo.



**Figura 13.** Gráfica comparativa del número de copias del ADNmt en sangre entre controles y pacientes con cáncer de mama. Se observa mayor número de copias de ADNmt en sangre de los controles en comparación con las pacientes ( $p= 0.0001$ , prueba U de Mann-Whitney).

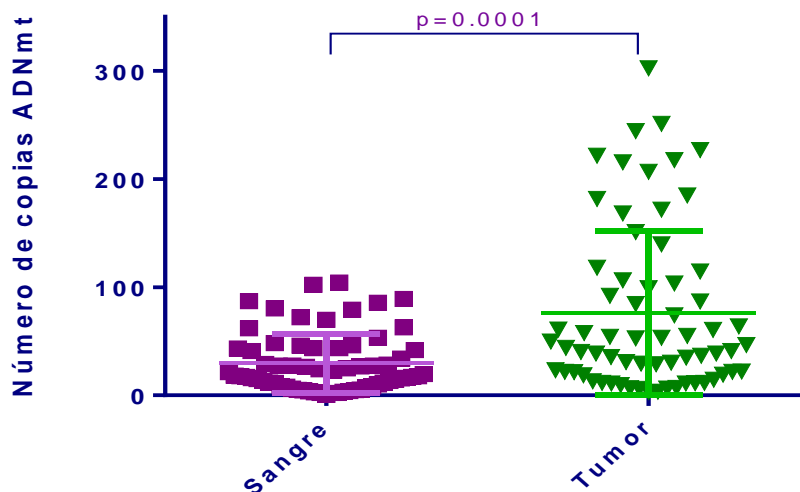
## Número de copias del genoma mitocondrial en tumores de mama

En el análisis pareado de sangre periférica-tumor se observó que las muestras de los tumores tienen mayor número de copias que la muestra de sangre periférica de la paciente. En los tumores se encontró un rango de 3.1 a 302.31 copias del ADNmt con un promedio de 76.0 (DE=  $\pm 76.0$ ) (Tabla 6). Las diferencias entre ambos grupos fueron estadísticamente significativas ( $p= 0.0001$ , prueba U de Mann-Whitney) (Fig. 14).

**Tabla 6.** Número de copias del ADNmt en pacientes

Tejido	n	Número de copias del ADNmt				p
		X	DE	Min	Max	
Sangre	66	29.7	27.3	0.4	104.3	0.0001
Tumor	66	76.0	76.0	3.1	302.3	

X: Promedio, DE: Desviación estándar, Min: Valor mínimo, Max: Valor máximo.



**Figura 14.** Gráfica comparativa del número de copias del ADNmt en Sangre y Tumor de pacientes con cáncer de mama. Se observa mayor número de copias del ADNmt en tumor que en sangre periférica ( $p= 0.0001$ , prueba U de Mann-Whitney).

### Número de copias del genoma mitocondrial por estadio clínico

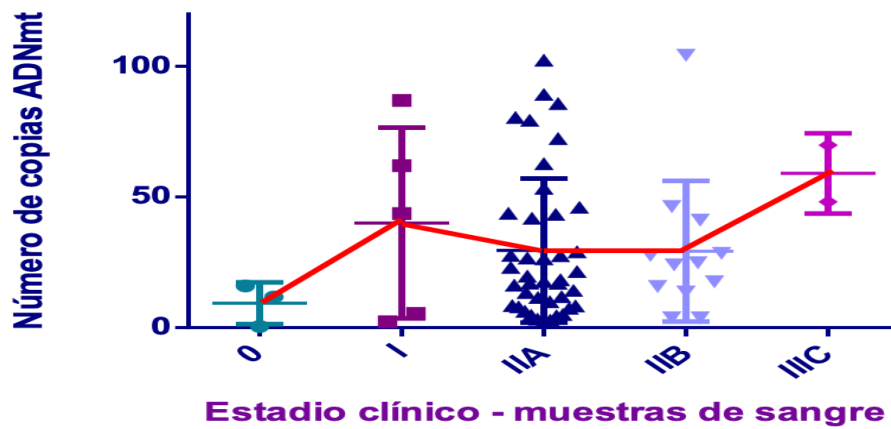
Se analizó el número de copias del genoma mitocondrial por estadio clínico en los grupos de las muestras de sangre periférica ( $p= 0.2489$ , prueba de Kruskal-Wallis) y tumor ( $p= 0.2837$ , prueba de Kruskal-Wallis) de las pacientes con cáncer de mama. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados (Tabla 7). Sin embargo, se observó mayor número de copias del ADNmt en estadios más agresivos del tumor en comparación con estadios tempranos, tanto en sangre (Fig. 15) como en tumor (Fig. 16).

**Tabla 7.** Número de copias del ADNmt por estadio clínico

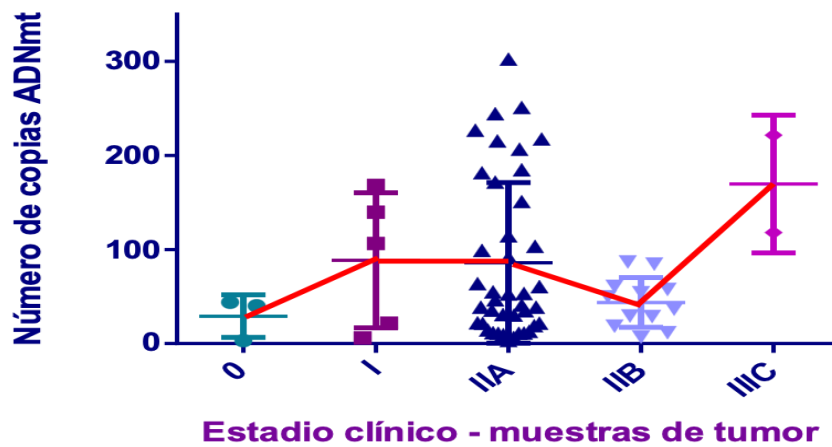
Clasificación	n	Número de copias del ADNmt									
		Sangre					Tumor				
		X	DE	Min	Max	p	X	DE	Min	Max	p
0	3	9.4	8.0	0.4	15.9		29.1	22.6	3.1	44.0	
I	5	40.1	36.5	2.3	87.0		88.4	71.7	5.9	168.3	
IIA	41	29.5	27.5	2.1	102.3	0.2489	85.8	85.4	3.4	302.3	0.2873
IIB	12	29.3	26.9	3.7	104.3		43.7	26.4	6.7	86.7	
IIIC	2	59.0	15.3	48.2	69.8		169.7	73.2	117.9	221.4	

X: Promedio, DE: Desviación estándar, Min: Valor mínimo, Max: Valor máximo.





**Figura 15. Gráfica comparativa del número de copias del ADNmt en muestras de sangre de pacientes en los diferentes estadios clínicos. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ( $p= 0.2489$ , prueba de Kruskal-Wallis).**



**Figura 16. Gráfica comparativa del número de copias del ADNmt en muestras de tumor de pacientes en los diferentes estadios clínicos. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ( $p= 0.2873$ , prueba de Kruskal-Wallis).**

## Número de copias del genoma mitocondrial por subtipo Inmunohistoquímico

En la clasificación por subtipo IHQ de las muestras de sangre de las pacientes encontramos que en el subtipo TN se observó el mayor número de copias ( $X= 44$ ,  $DE= \pm 39.9$ ) con un valor mínimo de 13.6 y valor máximo de 89.2. El de menor número de copias del ADNmt fue el subtipo luminal B con 23.4 ( $DE= \pm 25.3$ , valor mínimo de 3.3 y valor máximo de 85.7) (Fig. 17). En las muestras de tumor, el subtipo HER2 tuvo el mayor número de copias con un promedio de 132.7 ( $DE= \pm 125.5$ ) con un valor mínimo de 44 y un valor máximo de 221.4 (Fig. 18). De manera similar a los resultados de sangre periférica, el subtipo con menor número de copias en tumor fue el luminal B con 54.8 ( $DE= \pm 63.7$ ) con un valor mínimo de 11.5 y un valor máximo de 226.7 (Tabla 8). Después del análisis estadístico no se encontró diferencia significativa entre los grupos de las muestras de sangre ( $p= 0.6142$ , prueba de Kruskal-Wallis) y las muestras de tumor ( $p= 0.6927$ , prueba de Kruskal-Wallis).

**Tabla 8.** Número de copias del ADNmt por subtipo inmunohistoquímico

Clasificación	n	Número de copias del ADNmt									
		Sangre					Tumor				
		X	DE	Min	Max	p	X	DE	Min	Max	p
Luminal A	41	28.3	25.1	2.1	87.0		76.3	75.6	3.4	302.3	
Luminal B	10	23.4	25.3	3.3	85.7		54.8	63.7	11.5	226.7	
HER2	2	32.1	22.8	15.9	48.2	0.6142	132.7	125.5	44.0	221.4	0.6927
TN	3	44.0	39.9	13.6	89.2		93.3	105.7	29.2	215.3	
No asignado	10	36.8	36.9	0.4	104.3		79.2	81.5	3.1	251.1	

X: Promedio, DE: Desviación estándar, Min: Valor mínimo, Max: Valor máximo.

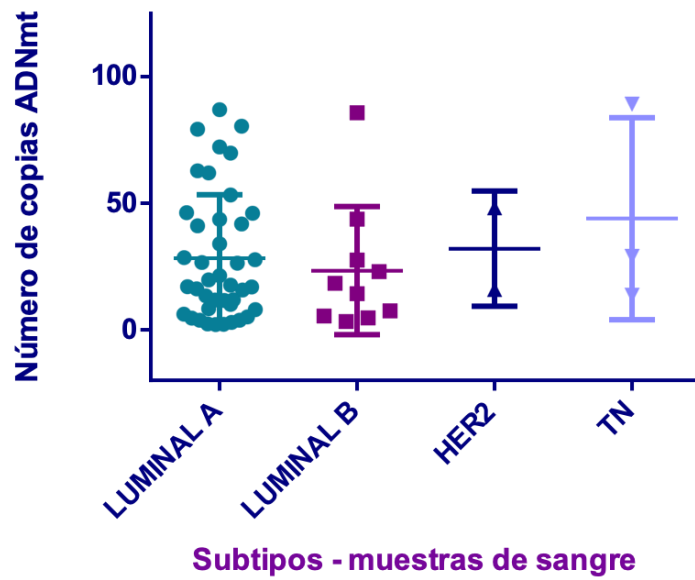


Figura 17. Gráfica comparativa del número de copias del ADNmt en los diferentes subtipos de cáncer de mama en muestras de sangre de pacientes. Análisis por subtipos inmunohistoquímicos del tumor ( $p = 0.6142$ , prueba de Kruskal-Wallis).

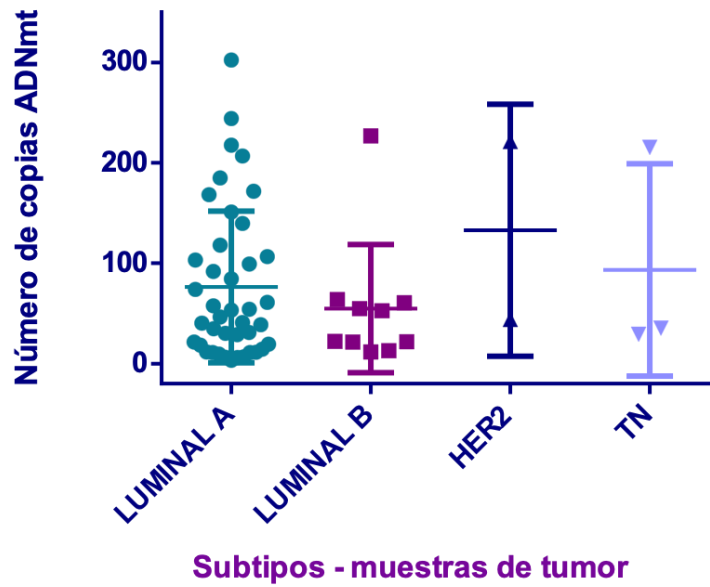


Figura 18. Gráfica comparativa del número de copias del ADNmt en los diferentes subtipos de cáncer de mama en muestras de tumores de pacientes. Análisis por subtipos inmunohistoquímicos del tumor ( $p = 0.6927$ , prueba de Kruskal-Wallis).

## DISCUSIÓN

---

El ADNmt ha tenido una gran relevancia en el estudio del cáncer, pues se ha observado que es esencial para el mantenimiento de la funcionalidad de la célula, ya que la presencia de diferentes tipos de alteraciones como mutaciones, deleciones, inserciones y cambios en el número de copias juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer (Lee et al., 2005). Se ha descrito que algunas de estas alteraciones pueden desencadenar cambios en el metabolismo de la célula y modificar la forma en que ésta obtiene energía aún en condiciones de hipoxia (Warburg, Wind, & Negelein, 1927). Otro efecto de las mutaciones en el genoma mitocondrial es la producción de especies reactivas de oxígeno que podrían generar una acumulación de mutaciones tanto en el ADN nuclear y mitocondrial y como consecuencia posibles modificaciones en el número de copias del genoma mitocondrial (Fliss et al., 2000; Shen et al., 2010). De hecho, se ha descrito que cambios en el número de copias del ADNmt confieren riesgo para padecer cáncer de mama y pueden estar asociadas con la sobrevida de los pacientes, aunque los resultados no han sido concluyentes (Hsu, Tseng, & Lee, 2016; Reznik et al., 2016).

Para determinar si las variaciones en el número de copias del ADNmt se asocian con la susceptibilidad a padecer cáncer de mama, se realizó un estudio caso-control en el que se incluyeron 63 muestras de mujeres sanas como grupo control y 66 muestras pareadas de sangre periférica-tumor de pacientes con cáncer de mama.

En relación a la edad de presentación de la enfermedad y a la frecuencia de los subtipos IHQ del tumor, el comportamiento de nuestra población de estudio fue similar a lo reportado previamente para la población mexicana (Maffuz-Aziz et al., 2017); la edad promedio de las pacientes fue de 53.8 (DE=  $\pm$  11 años), la mayoría (62.12%) de los casos se encontraban en la etapa IIA y el subtipo IHQ más común fue el luminal A (62.12%), seguido del luminal B (15.15%). Sin embargo, observamos una subrepresentación de los subtipos HER2 y TN (3.03% y 4.55%, respectivamente), en comparación con lo reportado por Maffuz y colaboradores en

2016, quienes estudiaron 4,411 pacientes y reportaron una frecuencia del 8.7% de HER2 y 14.6% de TN (Maffuz-Aziz et al., 2017). Las diferencias encontradas en nuestro estudio en comparación con lo reportado podrían ser principalmente por el sesgo que existe en la selección de las muestras, ya que, a diferencia del otro estudio, en esta investigación sólo se incluyeron pacientes que no tenían tratamiento previo y muchos de los casos TN ya habían iniciado su tratamiento al ingresar a la FUCAM.

### **Mayor número de copias del genoma mitocondrial en sangre periférica de mujeres sanas que en mujeres con cáncer de mama.**

Estudios previos donde se compara el número de copias del ADNmt en muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama comparados con muestras de sangre periférica de controles sanos han revelado resultados contradictorios. Por ejemplo, algunos estudios han observado que el incremento en el número de copias se asocia al riesgo a padecer cáncer de mama (Iqbal S, 2017; Lemnrau et al., 2015; Shen et al., 2010; Shen et al., 2015; Thyagarajan et al., 2013; Zhao et al., 2018), contrario a otros que reportaron que un bajo número de copias es un factor de riesgo (Kohler et al., 2009; P. Xia et al., 2009); mientras que en otros análisis no encontraron diferencia significativas entre casos y controles (Campa et al., 2018; Iqbal S, 2017; Jiang et al., 2014; Mi et al., 2015).

Nuestros resultados muestran que hay un menor número de copias del ADNmt en la sangre periférica de pacientes con cáncer de mama en comparación con lo que existe en las mujeres sanas ( $p= 0.0001$ , prueba U de Mann-Whitney). Nuestros hallazgos concuerdan con los obtenidos por Kohler y Xia en 2009. Kohler y colaboradores analizaron 78 muestras de pacientes y 70 controles de mujeres caucásicas. Los autores encontraron una diferencia significativamente menor en el número de copias del ADNmt entre casos y controles ( $p<0.001$ ). Por su parte, Xia y colaboradores evaluaron las muestras de 60 mujeres con cáncer de mama y 51 controles de población china y observaron que la disminución del número de copias

del ADNmt también se asocia con la presencia de la menopausia y la clasificación TNM.

Sin embargo, nuestros hallazgos difieren de los descritos por Shen y colaboradores en 2010, quienes analizaron 103 muestras de pacientes y 103 muestras de controles de población caucásica ( $p < 0.01$ ). En este estudio, los autores reportaron una asociación entre un incremento en el número de copias con el riesgo de presentar cáncer de mama, datos que fueron replicados en 2015 por el mismo grupo, pero analizaron 1000 pacientes con cáncer de mama y 1000 controles sanos de la misma población ( $p < 0.001$ ). Por otro lado, Lemnrau y colaboradores en 2015, analizando 1,108 pacientes y 1,099 controles, observaron una asociación entre un mayor número de copias con el riesgo a cáncer de mama en las muestras que fueron tomadas 6 años antes del diagnóstico. Thyagarajan y colaboradores en 2013, incluyendo 183 muestras de pacientes con cáncer de mama y 529 controles, reportaron que un mayor número de copias se asocia a mayor riesgo de presentar cáncer de mama y que este comportamiento se puede observar 3 años antes del diagnóstico. Más recientemente, en 2018, Zhao y colaboradores estudiaron las muestras de sangre periférica de mexico-americanos con 429 muestras de pacientes con diferentes tipos de cáncer y encontraron que el número de copias es significativamente mayor en los individuos que desarrollaron cáncer que en los controles ( $p = 0.007$ ).

En tres estudios no se encontraron diferencias significativas al comparar pacientes con cáncer de mama y controles sanos, sin embargo, al analizar subgrupos de pacientes sí encontraron diferencias, por ejemplo, Jiang y colaboradores en 2014 observaron una asociación entre el riesgo de cáncer de mama y un menor número de copias en mujeres premenopáusicas ( $p = 0.001$ ) y un incremento en el número de copias en mujeres postmenopáusicas ( $p = 0.027$ ) en población asiática. En 2017, Iqbal y colaboradores encontraron diferencia significativa al evaluar el estadio de las muestras de cáncer de mama observando mayor número de copias en el estadio III en comparación con estadios tempranos ( $p = 0.01$ ) y el estadio IV ( $p = 0.03$ ) en mujeres de la India. Por otro lado, Campa y colaboradores en 2018 observaron una

diferencia significativa al incorporar una medida de la integridad del genoma mitocondrial, es decir, analizaron el estado del genoma mitocondrial el cual puede presentar deleciones y estar dañado, esto podría estar relacionado con un incremento en el estrés oxidativo que puede afectar el genoma mitocondrial y aumentar la probabilidad de desarrollar cáncer de mama.

Por otra parte, en un meta-análisis donde se evaluó el número de copias del genoma mitocondrial en diferentes tipos de cáncer, se reportó una asociación entre el contenido de ADNmt de sangre periférica y cáncer de mama ( $p= 0.011$ ) (Hu et al., 2016). Ese mismo año, Chen y colaboradores observaron que un incremento en el número de copias en sangre periférica de pacientes con cáncer se asocia a peor pronóstico, pero un incremento en el número de copias en tejido tumoral es indicativo de un mejor pronóstico (Chen et al., 2016).

Las discrepancias entre nuestros resultados y los diferentes estudios puede deberse a la heterogeneidad de las muestras, a las metodologías utilizadas (PCR tiempo real y secuenciación) para la cuantificación del número de copias del genoma mitocondrial, los genes de elección para la cuantificación tanto los nucleares como los mitocondriales, las fórmulas matemáticas para el cálculo del número de copias, el tipo de muestra (sangre periférica y sus componentes), tamaño del número de muestras a analizar (n), población de estudio (asiática, caucásica, latina, etc.), los criterios de inclusión utilizados en la captación de los pacientes (con o sin tratamiento y tipo de tratamiento), así como la información clínica de los pacientes (estado pre y post menopausia, estadio de la enfermedad, subtipo molecular, variantes, ingesta de alcohol), además de aspectos biológicos como la presencia de variantes en el genoma mitocondrial (Chen et al., 2016; Jiang et al., 2014; Zhao et al., 2018).

## **Elevado número de copias del genoma mitocondrial en tumores de mama en comparación con la muestra pareada de sangre periférica de la paciente.**

En nuestro análisis se realizó la comparación entre sangre periférica y tejido tumoral de las pacientes con cáncer de mama y se observó que hay más copias de ADNmt en muestras de tumor que en sangre periférica ( $p= 0.0001$ , prueba U de Mann-Whitney).

Nuestros hallazgos contrastan con los resultados obtenidos de estudios donde se analizan el número de copias del ADNmt en tejido tumoral y del tejido adyacente al tumor, ya que se ha encontrado que hay menor número de copias del ADNmt en tejido tumoral que en tejido sano. Por ejemplo, Yu y colaboradores en 2007 analizaron 59 muestras de mujeres asiáticas con cáncer de mama y encontraron una disminución del número de copias del genoma mitocondrial en tumor en comparación con tejido adyacente al tumor ( $p= 0.001$ )(Yu et al., 2007). Asimismo, Fan y colaboradores observaron que las muestras de tumor tuvieron una disminución en el número de copias comparadas con tejido normal adyacente ( $p < 0.001$ )(Fan et al., 2009). Por su parte, Reznik en 2016, en un estudio con 22 diferentes tipos de tumores, observó que el número de copias disminuye en las muestras de tumor en comparación con el tejido normal adyacente (Reznik et al., 2016).

Las discrepancias entre nuestros resultados y los reportados en la literatura puede deberse al hecho de que todos ellos comparan el número de copias del ADNmt en tejido tumoral con el tejido adyacente, mientras que nuestro estudio se realiza en sangre periférica. Además, uno de los estudios evalúa el número de copias usando técnicas como secuenciación de nueva generación, mientras que en esta investigación se usó PCR-TR.



## **Número de copias del genoma mitocondrial por estadio clínico**

Existen evidencias que sugieren que en procesos cancerosos como el de mama, el número de copias del genoma mitocondrial podría verse alterado dependiendo del estadio de la enfermedad. En este sentido, Xia y colaboradores en 2009 analizaron las muestras de sangre periférica de 60 pacientes y 51 controles sanos y encontraron que el número de copias del ADNmt es significativamente menor en pacientes con cáncer de mama en estadio I que en otros estadios ( $p= 0.023$ ) (P. Xia et al., 2009) y más recientemente, Iqbal y colaboradores (2017), al analizar 126 muestras de sangre de pacientes con cáncer de mama y 29 controles sanos, documentaron un aumento en el número de copias en las muestras de las pacientes en estadio III en comparación con estadios más tempranos ( $p= 0.01$ ) y pacientes más tardíos ( $p= 0.03$ ) (Iqbal S, 2017).

En el presente estudio, el análisis del número de copias del ADNmt por estadio clínico no arrojó diferencias significativas entre los grupos de las muestras de sangre periférica ( $p= 0.2489$ , prueba de Kruskal-Wallis) y tumor ( $p= 0.2837$ , prueba de Kruskal-Wallis) Lo anterior puede deberse al bajo número de muestras que obtuvimos para los estadios 0, I y III (3, 5 y 2 respectivamente). El estadio IIA tuvo la mayor cantidad de muestras (41 muestras), esto se debe a que la mayoría de las pacientes se diagnostican en estas etapas. Sin embargo, al graficar el promedio del número de copias del ADNmt con relación a los estadios clínicos, se observa que en los estadios tempranos hay un menor número de copias comparado con los tumores en estadios más avanzados, este comportamiento se observó en las muestras de sangre y en las muestras de tumor. Sin embargo, se requiere validar este resultado en un mayor número de muestras.

## **Número de copias del genoma mitocondrial por subtipo Inmunohistoquímico (IHQ)**

Hasta el momento existen pocos datos sobre la relación entre variaciones en el número de copias del ADNmt y los subtipos moleculares del cáncer de mama.

Al comparar el número de copias del ADNmt en las muestras de sangre y tumor de pacientes con cáncer de mama no encontramos diferencias significativas entre los grupos de las muestras de sangre ( $p= 0.6142$ , prueba de Kruskal-Wallis) y las muestras de tumor ( $p= 0.6927$ , prueba de Kruskal-Wallis). Un resultado similar fue reportado por Weerts et al., 2016, analizando líneas celulares de cáncer de mama y muestras de tumor (M. J. Weerts et al., 2016).

Otro estudio en el que se evaluó la correlación entre número de copias del ADNmt y el subtipo de cáncer de mama, no se observaron diferencias significativas, sin embargo, se encontró una asociación entre la disminución del número de copias y las muestras con amplificación del gen *ERBB2*, el cual está involucrado tanto en la maquinaria bioenergética mitocondrial como en la programación de la muerte celular, posiblemente regulando cambios en la cantidad del ADNmt (Ebrahimi, Almasi-Hashiani, Ghaffari, & Shirkoohi, 2018).

### **Importancia del análisis del número de copias del genoma mitocondrial en cáncer de mama**

Múltiples estudios han dado evidencia de la relación entre el número de copias en el genoma mitocondrial y el cáncer de mama. Por ejemplo, Lee y colaboradores en el 2000, sugirieron que un incremento en el número de mitocondrias y del ADNmt son la primera respuesta de las células que están expuestas al estrés oxidativo endógeno o exógeno (Lee, Yin, Lu, Chi, & Wei, 2000; M. J. A. Weerts et al., 2019) y esto podría verse como un efecto compensatorio de la disminución de respiración normal de la célula (Iqbal S, 2017).

Shen y colaboradores en 2010, reportaron que el número de copias del ADNmt podría estar asociado con el riesgo a presentar cáncer de mama a través de mecanismos de estrés oxidativo, ya que el número de copias del ADNmt fue significativamente inverso con la presencia de oxidantes y antioxidantes exógenos en sangre (Shen et al., 2010).

Por otro lado, Yu y colaboradores en 2007, encontraron que la presencia de mutaciones en la región D-Loop o cerca de la región de replicación de la cadena pesada podría ser uno de los factores que contribuyan a la disminución del número de copias, por lo que sugirieron que un bajo número de copias del ADNmt en tumor podría estar involucrado en la transformación neoplásica o la progresión del cáncer de mama (Yu et al., 2007).

Nuestro estudio, es el primer trabajo realizado en México en donde se evalúa la relación entre el número de copias del ADNmt en pacientes con cáncer de mama y controles. En comparación con las mujeres sanas encontramos una disminución en el número de copias del genoma mitocondrial en las pacientes con esta neoplasia. Nuestros hallazgos son interesantes y de confirmarse en cohortes más grandes, con un mayor tiempo de seguimiento, el análisis del genoma mitocondrial podría utilizarse como un biomarcador de riesgo o de tamizaje para la identificación de mujeres en alto riesgo a padecer esta enfermedad. Lo anterior, sin duda, podría contribuir a la reducción de la incidencia y mortalidad de esta enfermedad tan prevalente en las mujeres de nuestro país.

Aunque este estudio presenta limitaciones en el tamaño de muestra, nuestros hallazgos apoyan las observaciones de que la mitocondria participa en el desarrollo del cáncer y revelan que el número de copias de este genoma se ve disminuido en pacientes con esta enfermedad. Aún falta el planteamiento de un estudio integral de genoma mitocondrial que incluya otros aspectos en el análisis, como el estudio de la secuencia completa del genoma o de las especies reactivas de oxígeno, así como con su correlación con variables clínicas de la enfermedad, incluyendo sobrevida y respuesta al tratamiento.

## CONCLUSIÓN

---

En este estudio se encontró que los niveles de ADNmt en muestras de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama son significativamente más bajos que en las muestras control. Adicionalmente observamos que el número de copias del ADNmt no correlaciona con el estadio clínico ni con el subtipo de cáncer de mama. Estos resultados sugieren que los niveles de ADNmt en muestras de sangre pueden estar asociados a la susceptibilidad de padecer cáncer de mama; sin embargo, se requieren estudios de validación a gran escala que nos permitan establecer los niveles de ADNmt como indicadores de un diagnóstico temprano y de progresión o agresividad de la enfermedad. Además, se requieren estudios integrales que ayuden a entender la participación e impacto de las variantes en los niveles del genoma mitocondrial en el cáncer de mama y sus posibles mecanismos de acción.

## PERSPECTIVAS

---

- ❖ Realizar un estudio prospectivo y longitudinal de casos y controles con un mayor número de muestras que permita identificar una posible asociación entre número de copias del ADNmt con los estadios clínicos, así como con los subtipos de cáncer de mama.
- ❖ Realizar un estudio integral donde se asocie el número de copias del ADNmt con la presencia de variantes en el genoma mitocondrial con especial atención en la presencia de estas variantes en la región reguladora de la replicación.
- ❖ Obtener información que ayude a encontrar una posible asociación entre el número de copias del ADNmt y la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama.
- ❖ Validar los resultados en una cohorte independiente.
- ❖ Incluir en el análisis muestras de tejido tumoral adyacente.

## LITERATURA CITADA

- Bai, R. K., Leal, S. M., Covarrubias, D., Liu, A., & Wong, L. J. (2007). Mitochondrial genetic background modifies breast cancer risk. *Cancer Res*, 67(10), 4687-4694. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3554
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6), 394-424. doi:10.3322/caac.21492
- Campa, D., Barrdahl, M., Santoro, A., Severi, G., Baglietto, L., Omichessan, H., . . . Kaaks, R. (2018). Mitochondrial DNA copy number variation, leukocyte telomere length, and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Breast Cancer Res*, 20(1), 29. doi:10.1186/s13058-018-0955-5
- Cárdenas-Sánchez, J., Erazo Valle, A., Arce-Salinas, C., Bargallo, E., Baustista-Piña, V., Cervantes-Sánchez, G., . . . Rodríguez-Cuevas, S. (2019). 19-Consenso Mexicano Ca Mama, Colima 2019, 8va edicion. *Gaceta Mexicana de Oncologia*, 18, 141.
- Chen, N., Wen, S., Sun, X., Fang, Q., Huang, L., Liu, S., . . . Qiu, M. (2016). Elevated Mitochondrial DNA Copy Number in Peripheral Blood and Tissue Predict the Opposite Outcome of Cancer: A Meta-Analysis. *Sci Rep*, 6, 37404. doi:10.1038/srep37404
- Chinnery, P. F. (1993). Mitochondrial Disorders Overview. In M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. Stephens, & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews((R))*. Seattle (WA).
- Curtis, C., Shah, S. P., Chin, S. F., Turashvili, G., Rueda, O. M., Dunning, M. J., . . . Aparicio, S. (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 486(7403), 346-352. doi:10.1038/nature10983
- Ebrahimi, E., Almasi-Hashiani, A., Ghaffari, K., & Shirkoohi, R. (2018). Mitochondrial DNA copy number instability in ERBB2-amplified breast cancer tumors. *EXCLI J*, 17, 149-158. doi:10.17179/excli2017-819
- “Estadísticas a propósito del...día mundial contra el cáncer (4 de febrero)” *Datos Nacionales*. (2018). Retrieved from
- Fan, A. X., Radpour, R., Haghighi, M. M., Kohler, C., Xia, P., Hahn, S., . . . Zhong, X. Y. (2009). Mitochondrial DNA content in paired normal and cancerous breast tissue samples from patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 135(8), 983-989. doi:10.1007/s00432-008-0533-9
- Gadkar, V., & Fillion, M. (2014). New Developments in Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction Technology. *Curr Issues Mol Biol*, 16, 1-6.
- Ghannam, M. G., & Varacallo, M. (2019). Biochemistry, Polymerase Chain Reaction (PCR). In *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Girish, C., Vijayalakshmi, P., Mentham, R., Rao, C. B., & Nama, S. (2014). A REVIEW ON BREAST CANCER. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 4(2), 47-54.

- Guía de reactivos Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR Systems. (2010). Retrieved from [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms\\_053238.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_053238.pdf)
- Hsu, C. C., Tseng, L. M., & Lee, H. C. (2016). Role of mitochondrial dysfunction in cancer progression. *Exp Biol Med (Maywood)*, *241*(12), 1281-1295. doi:10.1177/1535370216641787
- Hu, L., Yao, X., & Shen, Y. (2016). Altered mitochondrial DNA copy number contributes to human cancer risk: evidence from an updated meta-analysis. *Sci Rep*, *6*, 35859. doi:10.1038/srep35859
- Huang, J., Tan, L., Shen, R., Zhang, L., Zuo, H., & Wang, D. W. (2016). Decreased Peripheral Mitochondrial DNA Copy Number is Associated with the Risk of Heart Failure and Long-term Outcomes. *Medicine (Baltimore)*, *95*(15), e3323. doi:10.1097/MD.00000000000003323
- Iqbal S, R. V., Balani S, Sharma S, Vishnubhatla S, Gogia A, et al. (2017). Higher Mitochondrial DNA Content in Peripheral Blood of Stage III Breast Cancer Patients. *Austin Oncol*, *2*(1).
- Irigoyen, M. A., Garcia, F. V., Iturriagagoitia, A. C., Beroiz, B. I., Martinez, M. S., & Guillen Grima, F. (2011). [Molecular subtypes of breast cancer: prognostic implications and clinical and immunohistochemical characteristics]. *An Sist Sanit Navar*, *34*(2), 219-233. doi:10.4321/s1137-66272011000200008
- Jiang, H., Zhao, H., Xu, H., Hu, L., Wang, W., Wei, Y., . . . Zhou, F. (2014). Peripheral blood mitochondrial DNA content, A10398G polymorphism, and risk of breast cancer in a Han Chinese population. *Cancer Sci*, *105*(6), 639-645. doi:10.1111/cas.12412
- Jimenez-Morales, S., Perez-Amado, C. J., Langley, E., & Hidalgo-Miranda, A. (2018). Overview of mitochondrial germline variants and mutations in human disease: Focus on breast cancer (Review). *Int J Oncol*, *53*(3), 923-936. doi:10.3892/ijo.2018.4468
- Knaul, F. M., Nigenda, G., Lozano, R., Arreola-Ornelas, H., Langer, A., & Frenk, J. (2009). Cáncer de mama en México: una prioridad apremiante. *Salud Pública de México*, *51*.
- Kohler, C., Radpour, R., Barekati, Z., Asadollahi, R., Bitzer, J., Wight, E., . . . Zhong, X. Y. (2009). Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol Cancer*, *8*, 105. doi:10.1186/1476-4598-8-105
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., . . . Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, *27*(2-3), 95-125. doi:10.1016/j.mam.2005.12.007
- Lee, H. C., Yin, P. H., Lin, J. C., Wu, C. C., Chen, C. Y., Wu, C. W., . . . Wei, Y. H. (2005). Mitochondrial genome instability and mtDNA depletion in human cancers. *Ann N Y Acad Sci*, *1042*, 109-122. doi:10.1196/annals.1338.011
- Lee, H. C., Yin, P. H., Lu, C. Y., Chi, C. W., & Wei, Y. H. (2000). Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J*, *348 Pt 2*, 425-432.
- Lemnrau, A., Brook, M. N., Fletcher, O., Coulson, P., Tomczyk, K., Jones, M., . . . Garcia-Closas, M. (2015). Mitochondrial DNA Copy Number in Peripheral

- Blood Cells and Risk of Developing Breast Cancer. *Cancer Res*, 75(14), 2844-2850. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1692
- Libson, S., & Lippman, M. (2014). A review of clinical aspects of breast cancer. *Int Rev Psychiatry*, 26(1), 4-15. doi:10.3109/09540261.2013.852971
- Maffuz-Aziz, A., Labastida-Almendaro, S., Espejo-Fonseca, A., & Rodriguez-Cuevas, S. (2017). [Clinical and pathological features of breast cancer in a population of Mexico]. *Cir Cir*, 85(3), 201-207. doi:10.1016/j.circir.2016.08.004
- McDermott, M. M., Peterson, C. A., Sufit, R., Ferrucci, L., Guralnik, J. M., Kibbe, M. R., . . . Leeuwenburgh, C. (2018). Peripheral artery disease, calf skeletal muscle mitochondrial DNA copy number, and functional performance. *Vasc Med*, 23(4), 340-348. doi:10.1177/1358863X18765667
- Mi, J., Tian, G., Liu, S., Li, X., Ni, T., Zhang, L., & Wang, B. (2015). The relationship between altered mitochondrial DNA copy number and cancer risk: a meta-analysis. *Sci Rep*, 5, 10039. doi:10.1038/srep10039
- Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., . . . Stratton, M. R. (2016). Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*, 534(7605), 47-54. doi:10.1038/nature17676
- Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., . . . Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747-752. doi:10.1038/35021093
- Provenzano, E., Ulaner, G. A., & Chin, S. F. (2018). Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clin*, 13(3), 325-338. doi:10.1016/j.cpet.2018.02.004
- Reznik, E., Miller, M. L., Senbabaoglu, Y., Riaz, N., Sarungbam, J., Tickoo, S. K., . . . Sander, C. (2016). Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. *Elife*, 5. doi:10.7554/eLife.10769
- Sheikh, A., Hussain, S. A., Ghori, Q., Naeem, N., Fazil, A., Giri, S., . . . Al Tamimi, D. M. (2015). The spectrum of genetic mutations in breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(6), 2177-2185. doi:10.7314/apjcp.2015.16.6.2177
- Shen, J., Platek, M., Mahasneh, A., Ambrosone, C. B., & Zhao, H. (2010). Mitochondrial copy number and risk of breast cancer: a pilot study. *Mitochondrion*, 10(1), 62-68. doi:10.1016/j.mito.2009.09.004
- Shen, J., Wan, J., Song, R., & Zhao, H. (2015). Peripheral blood mitochondrial DNA copy number, length heteroplasmy and breast cancer risk: a replication study. *Carcinogenesis*, 36(11), 1307-1313. doi:10.1093/carcin/bgv130
- Shiovitz, S., & Korde, L. A. (2015). Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann Oncol*, 26(7), 1291-1299. doi:10.1093/annonc/mdv022
- Solano Abelardo, P. A., López-Pérez Manuel J., Montoya Julio. (2001). Enfermedades genéticas del ADN mitocondrial humano. *Salud pública Méx [revista en la Internet]*, 43(2), 151:161.
- Thyagarajan, B., Wang, R., Nelson, H., Barcelo, H., Koh, W. P., & Yuan, J. M. (2013). Mitochondrial DNA copy number is associated with breast cancer risk. *PLoS One*, 8(6), e65968. doi:10.1371/journal.pone.0065968
- Torres, J. A. T. (2013). Mutación en el ADN mitocondrial y su relación con el cáncer de mama. *Revista de especialidades médico-quirúrgicas* 18, 345-349.

- Turashvili, G., & Brogi, E. (2017). Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Front Med (Lausanne)*, 4, 227. doi:10.3389/fmed.2017.00227
- Umemura, S., & Osamura, R. Y. (2004). Utility of immunohistochemistry in breast cancer practice. *Breast Cancer*, 11(4), 334-338. doi:10.1007/BF02968039
- Vuong, D., Simpson, P. T., Green, B., Cummings, M. C., & Lakhani, S. R. (2014). Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch*, 465(1), 1-14. doi:10.1007/s00428-014-1593-7
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol*, 8(6), 519-530. doi:10.1085/jgp.8.6.519
- Weerts, M. J., Sieuwerts, A. M., Smid, M., Look, M. P., Foekens, J. A., Sleijfer, S., & Martens, J. W. (2016). Mitochondrial DNA content in breast cancer: Impact on in vitro and in vivo phenotype and patient prognosis. *Oncotarget*, 7(20), 29166-29176. doi:10.18632/oncotarget.8688
- Weerts, M. J. A., Sleijfer, S., & Martens, J. W. M. (2019). The role of mitochondrial DNA in breast tumors. *Drug Discov Today*, 24(5), 1202-1208. doi:10.1016/j.drudis.2019.03.019
- Winters, S., Martin, C., Murphy, D., & Shokar, N. K. (2017). Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 151, 1-32. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.07.002
- Xia, Liu, Y., Yang, H. R., Yang, H. Y., Liu, J. X., Ma, Y. N., & Qi, Y. (2017). Reference Intervals of Mitochondrial DNA Copy Number in Peripheral Blood for Chinese Minors and Adults. *Chin Med J (Engl)*, 130(20), 2435-2440. doi:10.4103/0366-6999.216395
- Xia, P., An, H. X., Dang, C. X., Radpour, R., Kohler, C., Fokas, E., . . . Zhong, X. Y. (2009). Decreased mitochondrial DNA content in blood samples of patients with stage I breast cancer. *BMC Cancer*, 9, 454. doi:10.1186/1471-2407-9-454
- Yadav, N., & Chandra, D. (2013). Mitochondrial DNA mutations and breast tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1836(2), 336-344. doi:10.1016/j.bbcan.2013.10.002
- Yu, M., Zhou, Y., Shi, Y., Ning, L., Yang, Y., Wei, X., . . . Niu, R. (2007). Reduced mitochondrial DNA copy number is correlated with tumor progression and prognosis in Chinese breast cancer patients. *IUBMB Life*, 59(7), 450-457. doi:10.1080/15216540701509955
- Zaha, D. C. (2014). Significance of immunohistochemistry in breast cancer. *World J Clin Oncol*, 5(3), 382-392. doi:10.5306/wjco.v5.i3.382
- Zhao, H., Chang, D., Ye, Y., Shen, J., Chow, W. H., & Wu, X. (2018). Associations of blood mitochondrial DNA copy number with social-demographics and cancer risk: results from the Mano-A-Mano Mexican American Cohort. *Oncotarget*, 9(39), 25491-25502. doi:10.18632/oncotarget.25321