



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE MEDICINA**



**CENTRO MEDICO NACIONAL “20 DE NOVIEMBRE”  
ISSSTE**

**Título: “Prevalencia de Polimorfismo Mitocondrial (10398A) en pacientes con Cáncer de Mama del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre”**

# **T E S I S**

**Que para obtener Título de:**

**MEDICO ESPECIALISTA EN ONCOLOGICA MÉDICA**

**P R E S E N T A**

**Dr. Abraham Ruíz García.**

**Asesor clínico:**

**Dra. Aura Argentina Erazo Valle Solís.**

**México, Distrito Federal. 2012.**

**REGISTRO 292-2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

AUTORIZACIÓN DE TESIS

**“Prevalencia de Polimorfismo Mitocondrial (10398A) en pacientes con Cáncer de Mama del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre”**

**NO. DE REGISTRO: 292.2011**

---

**DRA. AURA ARGENTINA ERAZO VALLE SOLIS**

SUBDIRECTORA DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN DEL CENTRO MEDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE Y PROFESORA TITULAR DEL CURSO.

---

**DRA. GUADALUPE CERVANTES SANCHEZ**

JEFE DE SERVICIO Y PROFESORA ADJUNTO DEL CURSO.

---

**DRA. AURA ARGENTINA ERAZO VALLE SOLIS**

TUTOR DE TESIS.

---

**DR ABRAHAM RUIZ GARCÍA**

TESISTA

## AGRADECIMIENTOS

**Gracias infinitas a mis Padres:**

**Por todo su apoyo, comprensión y paciencia, gracias por guiarme y enseñarme las grandes cosas por lo que vale la pena luchar, gracias por enseñarme a perder y ser humilde, gracias por enseñarme a soñar y lograr mis sueños, Gracias por todos los valores que me inculcaron y que me hacen una persona íntegra, Gracias por enseñarme a vencer mis miedos, Gracias por darme la vida....**

**A mis queridos hermanos Pili y Carlos:**

**Por todas las aventuras desde la infancia, Gracias por todo su amor de hermanos mayores, Gracias por ayudarme a abrirme camino ante la vida, Gracias por ser quienes son pues nunca los cambiaría....**

**Gracias a mis amigos "Fantásticos":**

**Por estar siempre en los momentos difíciles como familia, Gracias por su amistad que ya tiene buen rato que inició y que sigue siendo la misma desinteresada y alegre, Gracias Pájaro y Mari Jo *you know why!!!! ....***

**Gracias a mis compañeros del CMN 20 de Noviembre:**

**Por su tolerancia en mis momentos de desesperación, por su apoyo en los momentos de frustración, Gracias por hacer el día a día de la vida Hospitalaria más llevadero, Gracias a la "more" por todo su apoyo en la elaboración de ésta tesis y por ser mi gran amiga....**

**Gracias a mis Maestros y Maestras del CMN 20 de Noviembre:**

**Por su enseñanza, Gracias por compartir su experiencia con nosotros, Gracias a la Dra Erazo pues sin ella simplemente no hubiera sido posible la realización y culminación de éste trabajo....**

**Gracias a los laboratorios de CMN 20 de Noviembre por su enseñanza y paciencia durante la elaboración de éste trabajo**

**Es Difícil nombrar a todas las personas que han puesto su granito de arena y que han dejado huella en mi vida, pero ustedes saben quiénes son y no saben lo infinitamente agradecido que estoy. Sé que debo mucho, pero espero estar siempre ahí para cualquiera que me necesiten.**

**iiiiGRACIAS Y HASTA LUEGO!!!!**

<b>INDICE</b>	<b>Página</b>
Agradecimientos	2
Definición del Problema	4
Antecedentes	5
Justificación	7
Hipótesis	8
Objetivo	9
Material y Métodos	10
Consideraciones éticas	17
Resultados	19
Discusión	27
Conclusiones	29
Anexos	30
Bibliografía	34

## **DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.**

¿Cual es la prevalencia del polimorfismo de DNA mitocondrial (G10398A) en el cáncer de mama en pacientes atendidas en el servicio de oncología del CMN 20 de Noviembre?

## ANTECEDENTES:

A nivel mundial en el año 2008 el cáncer de mama ocupa el 2do lugar en incidencia general, después de cáncer de pulmón, atribuyéndose 10.9% de casos por cáncer y el 5to lugar en mortalidad general con 6.1% de todas las muertes por cáncer. En mujeres a nivel mundial el cáncer de mama ocupa el primer lugar en incidencia con 22.9% de los casos de cáncer y el primer lugar en mortalidad atribuyéndose el 13.7% de las defunciones por cáncer<sup>1</sup>

En México en el 2008 el cáncer de mama ocupó el 2do lugar en incidencia en ambos sexos, siendo en mujeres el primer lugar con 21% de todos los tipos de cáncer en este género (13,939 casos)<sup>1</sup>. En mujeres el cáncer de mama ocupa el tercer lugar como causa de mortalidad global, atrás de cáncer de pulmón y de próstata con 5217 muertes representando el 6.7% de las muertes por cáncer, en mujeres ocupa el primer lugar como causa de mortalidad, atribuyéndose el 13.3% de las defunciones por cáncer.<sup>2</sup>

El cáncer de mama es una enfermedad multifactorial, en adición al riesgo alto de genes como BRCA1 y BRCA2, hay una serie de combinaciones de efectos genéticos, exposición al medio ambiente e interacciones ambientales-genéticas que contribuyen al incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de mama<sup>3</sup>

La mitocondria juega un papel fundamental en la producción celular de energía, alrededor del 90% del ATP celular se produce por la cadena de transporte de electrones en el interior de la membrana mitocondrial. Esta cadena consiste en un complejo de proteínas con múltiples subunidades de productos de genes del genoma mitocondrial y nuclear<sup>4</sup>.

El DNA mitocondrial codifica 13 subunidades de la cadena de transporte de electrones, así como un set de distintos rRNA y tRNA.

Bajo condiciones fisiológicas, el 2% de las pérdidas de electrones de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y oxígeno reducido a anión superóxido, desencadena la formación de una cascada de radicales libres que indiscriminadamente dañan macromoléculas biológicas.<sup>5</sup>

La mitocondria es el mayor proveedor de radicales libres de oxígeno, llamados en conjunto especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). La mitocondria es especialmente susceptible a daño por ROS ya que la falta de intrones en el genoma mitocondrial tiene una capacidad limitada de reparo.

In vitro, estudios han mostrado que las variaciones del mtDNA tienen efecto en la actividad de la cadena respiratoria, la suma de cambios sutiles pueden causar consecuencias significantes. Algunas variaciones del mtDNA pueden tener sinergia en combinación con otras mutaciones del mtDNA<sup>6</sup>. La expresión patogénica de mutaciones mtDNA homoplasmicas pueden requerir una interacción del complejo nuclear-mitocondrial. Algunos estudios han sugerido que el polimorfismo del mtDNA se asocia con diversas enfermedades incluyendo Enfermedad de Alzheimer<sup>7</sup>, Infarto agudo al miocardio<sup>8</sup>, enfermedad bipolar<sup>9</sup>, neuropatía óptica hereditaria de Leber, enfermedad de Parkinson, enfermedad vascular cerebral<sup>10</sup>

El papel primordial de la mitocondria es al metabolismo energético, la generación de ROS, la iniciación de apoptosis y otros aspectos de la biología del tumor han resaltado la importancia de la función mitocondrial en los procesos neoplásicos, ya que el incremento en la producción de ROS y el daño resultante en el DNA mitocondrial (mtDNA) y DNA nuclear han mostrado un papel clave en la carcinogénesis por inestabilidad genética<sup>11</sup>

Los ROS juegan múltiples papeles en la iniciación del tumor, progresión y mantenimiento. Las mutaciones somáticas se han identificado en una gran variedad de tumores incluyendo cáncer de mama,

cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer hepatocelular, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides, cáncer de esófago y tumores cerebrales.

La susceptibilidad a los efectos de la disfunción mitocondrial es particularmente importante en cáncer inducible por estrógenos, como el cáncer de mama, porque el metabolismo normal estradiol a través de intermediarios redox puede generar ROS y lesión oxidativa en la mama que facilita la transformación neoplásica.

El polimorfismo de mtDNA G10398A resulta en una sustitución de aminoácido no conservativa de treonina (codificada por el alelo A) por alanina (codificada por el alelo G) dentro de la dehidrogenasa NADH (ND3) subunidad del complejo 1.

Estudios epidemiológicos han sugerido que el alelo 10398A se asocia con un fenotipo degenerativo, mientras el alelo 10398G es usualmente protector

Los efectos bioquímicos del polimorfismo del mtDNA G10398A, no esta completamente comprendido, varias líneas evidencian que se incrementa la producción de ROS (estrés oxidativo) debido a alteración de la función del complejo 1.

Varios de los estudios se han enfocado a un limitado número de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) del mtDNA; estos estudios han mostrado que mtDNA 10398A incrementa el riesgo de cáncer de mama invasivo en mujeres Afroamericanas<sup>12</sup>

Aproximadamente 80% de los blancos poseen el alelo 10398A, mientras que la prevalencia desde este alelo en individuos Africanos se reporta en 5%.

Un estudio preliminar de la Universidad de Vanderbilt (48 casos, 54 controles) descubrieron una asociación entre el alelo 10398A y cáncer de mama invasivo en mujeres Afro-Americanas (OR), 2.90; 95% intervalo de confianza, 0.61-18.3; p=0.11.

Posteriormente se validó esta característica en un estudio de casos y controles de cáncer de mama, (estudio de Cáncer de Mama de Carolina de la Universidad del Norte de Carolina) -654 casos,605 controles-; las mujeres Africo-americanas de este estudio con el alelo 10398A presentaron un riesgo incrementado de cáncer de mama invasivo (OR 1.60; 95% CI 1.10-2.31; p=0.013) el alelo 10398A fue un factor de riesgo independiente posterior a ajustar a otros factores de riesgo para cáncer de mama



## **JUSTIFICACIÓN:**

Existe evidencia de que en mujeres con polimorfismo mitocondrial (10398A) tienen predisposición a cáncer de Mama en otras poblaciones. 3-5,11,13.

Este polimorfismo no ha sido explorado en población mexicana, por lo que consideramos importante conocer la prevalencia del polimorfismo mitocondrial, inicialmente en la población derechohabiente del ISSSTE y de acuerdo a resultados valorar la posibilidad de extenderlo a población abierta. Con la información obtenida tendremos un mejor entendimiento de la biología del cáncer de mama en nuestra población y eventualmente relacionarlo con las opciones terapéuticas disponibles.

**HIPOTESIS:**

Por ser un estudio de prevalencia no requiere hipótesis

## **OBJETIVOS:**

### **GENERAL:**

Determinar la prevalencia de polimorfismo mitocondrial (10398A) en pacientes con cáncer de mama del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre

### **ESPECÍFICOS:**

Conocer los estadios de cáncer de mama tratado en el servicio de Oncología del CMN 20 de Noviembre.

Conocer la edad más frecuentemente afectada con Cáncer de Mama tratado en el servicio de Oncología del CMN 20 de Noviembre.

Conocer la frecuencia de los factores de riesgo conocidos para cáncer de mama en las pacientes tratado en el servicio de Oncología del CMN 20 de Noviembre.

Conocer la frecuencia de los marcadores pronósticos y predictivos (Receptores hormonales y Her2/neu) en cáncer de mama.

## **DISEÑO:**

### **TAMAÑO DE LA MUESTRA:**

No hay antecedentes en la literatura nacional sobre el polimorfismo mitocondrial (10398A) y su relación con el cáncer de mama. Por ser un estudio piloto nacional no se realiza cálculo de muestra.

### **DEFINICIÓN DE LAS UNIDADES DE OBSERVACIÓN:**

Pacientes con diagnóstico cáncer de mama, independientemente del estado clínico (IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC, IV) y tratamiento, Se incluirán 50 pacientes en Total.

### **CRITERIOS DE INCLUSIÓN:**

Consentimiento informado. (anexo 1)

Confirmación histopatológica (determinación de receptores hormonales y Her2Neu )

Mujeres entre 18 y 70 años. (mayores de 70 años a consideración del Investigador).

Enfermedad en etapa I, II, III o IV

Estado funcional (ECOG) 0, 1,2,3

Función Cardíaca, hepática y renal normales

Requisitos de Laboratorio

Función renal: Creatinina sérica  $\leq 1.5$  mg/dl

Función hepática: Bilirrubina total  $\leq 1$ U LN, ASAT(SGTO) y ALAT (SGPT)  $\leq 2.5$ ULN, Fosfatasa Alcalina  $\leq 5$  LN

Las Pacientes con ASAT y/o ALAT  $> 1.5$  LNS asociados con fosfatasa alcalina  $> 2.5$  LNS no se consideran aptas para el estudio.

### **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

1. -Tratamiento Previo para el Cáncer de Mama (Inmunoterapia, Hormonoterapia, Quimioterapia, Radioterapia)
2. -Antecedentes o condición actual de neoplasia diferente del carcinoma de mama.
3. -Tratamiento Crónico con Corticoesteroides.
4. -Participación en otro Estudio de Investigación

### **CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:**

Deseo de abandonar el estudio.

### **DEFINICIÓN DE VARIABLES Y UNIDADES DE MEDIDA:**

**Edad:** Variable cuantitativa, discreta, con unidad de medición en años, la cual es definida como número de años cumplidos.

**Número de paciente:** Variable cuantitativa, discreta, con unidad de medición de números enteros a partir del 1; el cuál se asignará de acuerdo al orden en el momento de registro de ingreso al estudio.

**Peso:** Variable cuantitativa, continua, con unidad de medición en Kilogramos, y al cuál corresponderá al paciente al momento del ingreso al estudio.

**Talla:** Variable cuantitativa, continua, con unidad de medición en metros y hasta 2 decimales; la cuál corresponderá a la estatura del paciente al ingreso al protocolo.

**Fecha de ingreso al proyecto:** Variable cualitativa, nominal, su escala será determinada en día/mes/año

**Fecha de diagnóstico:** Variable cualitativa, nominal, su escala será determinada en día/mes/año.

**Estadificación clínica:** Variable cualitativa, ordinal. El sistema de Estadificación es de acuerdo a Tumor-Ganglio-Metástasis del American Joint Committee on Cancer (AJCC) 2010; el cuál divide los tumores Mama.

Las definiciones para involucro de ganglios linfáticos regional (N) y metástasis a distancia (M) son uniformes para todas las regiones. La definición de N esta basada en el tamaño y lateralidad de los ganglios involucrados,

La estadificación para el tumor primario (T) se refiere al tamaño del tumor e involucro de tejidos adyacentes;

Quedando agrupados por estadios:

IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC, IV

**Sitio de Metástasis al Diagnóstico:** Variable cualitativa nominal, órgano o tejido con presencia de metástasis al momento del diagnóstico en pacientes con diagnóstico inicial de un estadio clínico IV

**Antecedentes de importancia:** Variable cualitativa, nominal, sin unidad de medición, que consiste en incorporar aquellos antecedentes personales no patológicos y personales patológicos que se consideren de importancia para su padecimiento neoplásico en estudio o del tratamiento a recibir.

**Fecha de laboratorios:** Variable cualitativa, nominal, su escala será registrada de acuerdo a día/mes/año

**Mutación mitocondrial:** Variable cualitativa nominal, sin unidad de medición consiste en la presencia o ausencia.

**Receptores Hormonales:** Variable cualitativa, nominal, sin unidad de medición. Consiste en la presencia o ausencia de los receptores de estrógenos y/o progesterona de acuerdo al porcentaje de expresión valorado por inmunohistoquímica (positivo: >10% de expresión).

**Her2/neu:** Variable cualitativa, nominal, sin unidad de medición. Consiste en la presencia o ausencia de la expresión del receptor en la membrana celular de acuerdo al porcentaje de expresión valorado por inmunohistoquímica (positivo: +++) o Por la medición de la sobreexpresión del gen por medio de FISH (FISH +).

**Postmenopausia:** Variable cualitativa nominal, sin unidad de medición consiste en la o ausencia de ciclos menstruales por al menos un año.

**Lactancia acumulada:** Variable cuantitativa discreta, medida en número de meses.

**Edad a la menopausia:** Variable cualitativa, discreta, medida en años.

**Edad al primer embarazo:** Variable cualitativa, discreta, medida en años.

**Uso de Terapia Hormonal de Reemplazo:**

**Segunda Neoplaisa:** Variable cualitativa nominal, presencia de una neoplasia maligna distinta al cáncer de mama.

**Sitio de segunda neoplasia:** Variable cualitativa nominal, tejido u órgano del cual se originó la segunda neoplasia.

**Familiar con cáncer de mama:** Variable cualitativo nominal, Presencia de un familiar en primer grado con cualquier noeoplasia maligna.

**Familiar afectado:** Variable cualitativa nominal, Relación genealógica (abuelos, padres, hermanos, hijos, tios y primos en primer grado).

**Sitio afectado en familiar:** Variable cualitativa nominal, tejido u órgano con neoplasia maligna en un familiar de primer grado.

**Tabaquismo:** Variable cualitativa nominal, Presencia de antecedente de haber fumado, independientemente del tiempo de haber suspendido, la cantidad o la fecha de inicio.

**Etilismo:** Variable cualitativa nominal, Presencia de antecedente de haber consumido bebidas alcohólicas, independientemente del tiempo de haber suspendido, la cantidad o la fecha de inicio.

**Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2):** Variable cualitativa nominal, Presencia o ausencia de diagnóstico de Diabetes Mellitus, definida como 2 mediciones de glucosa sérica en ayuno, con valores por arriba de 126mg/dl, Una determinación al azar por arriba de 200 mg/dl con presencia de síntomas clínicos y Una determinación con curva de tolerancia a la glucosa, con un valor por arriba de 200 mg/dl a las 2 hrs.

**Hipertensión Arterial (HTA):** Variable cualitativa nominal, Presencia o ausencia de diagnóstico de HTA, definida como 2 mediciones con cifras por arriba de 140/90 mmHg.

**Menarca:** Variable cuantitativa discreta, Número de años cumplidos al momento de la primera menstruación.

**Gesta:** Variable cuantitativa discreta, Número de ocasiones en la que se embarazado una paciente.

**Para:** Variable cuantitativa discreta, Número de partos que ha tenido una paciente.

**Abortos:** Variable cuantitativa discreta, Número de abortos que ha presentado una paciente.

**Cesáreas:** Variable cuantitativa discreta, Número de cesáreas que ha presentado una paciente.

#### SELECCIÓN DE LAS FUENTES, MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN:

Mujeres mestizas mexicanas con cáncer de mama.

La información obtenida se recabará en los formatos de Hojas de Recolección de Datos que serán los siguientes: (anexo 2)

1 Registro basal: Este formato registrará datos personales, antecedentes de importancia (no patológicos y patológicos), etapificación de acuerdo al sistema de estadificación del AJCC 2010.

2) Registro de citas: se realizara en 1 sola ocasión para toma de muestra de sangre.

#### DEFINICIÓN DEL PLAN DE PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE LA INFORMACIÓN:

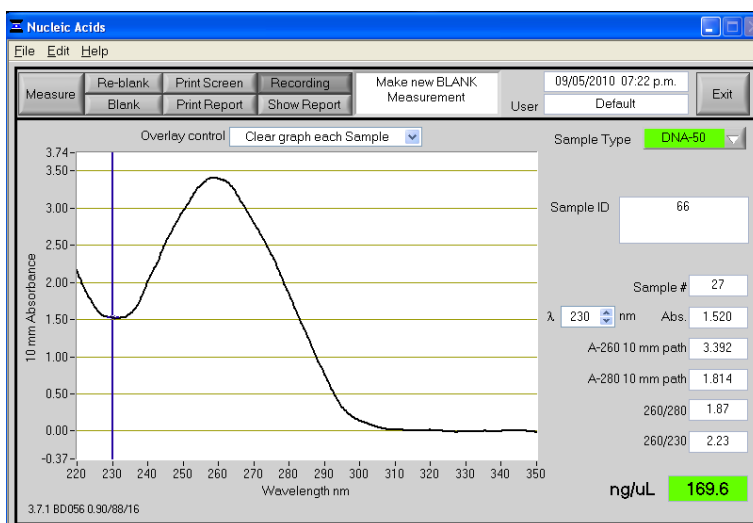
**Método de Extracción de DNA Extracción de DNA modificado de :Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G et al. A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood. Biotechniques. 1991;11:298-300, 302**

1. Se toma una muestra de sangre (5-10ml) en un tubo con EDTA como anticoagulante.
2. Se colocan 300 $\mu$ l de sangre en un tubo Eppendorf estéril de 1.5ml.
3. Se añaden 600 $\mu$ l de DTAB al 8% (Sigma)(1.5M, EDTA 50mM, Tris 100mM pH 8.7) al tubo Eppendorf con sangre. Se mezcla y calienta a 68°C durante 5 minutos.
4. Se añaden 550 $\mu$ l de Cloroformo al 100% y se agita manualmente con fuerza durante 5 minutos.
5. Se centrifuga a 13,000 rpm durante 10 minutos.
6. Después de la centrifugación quedarán 2 fases una fase proteinéica al fondo del tubo y una fase acuosa transparente en la superficie, la fase acuosa se transfiere a un nuevo tubo Eppendorf del mismo volumen sin tomar partículas de la fase proteinéica.
7. Al nuevo tubo con la fase acuosa se le añaden 100 $\mu$ l de CTAB al 5% (Sigma) (NaCl 0.4M), se mezclan y se añaden 750 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O estéril (ampolleta). Se mezcla despacio hasta que las fases se unifican.
8. Se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos.
9. Se descarta el sobrenadante y se conserva el precipitado.
10. Al nuevo tubo con el precipitado se le añaden 200 $\mu$ l de NaCl 1.2M, se re-suspende el precipitado y se agregan 850  $\mu$ l de Etanol al 100 % frío, mezclar y dejar precipitar en frío durante 10 minutos.
11. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min.
12. Descartar sobrenadante y conservar precipitado. Agregar 500  $\mu$ l de Etanol al 70%.
13. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 minutos y repetir, el lavado con Etanol al 70% una vez más y centrifugar en las mismas condiciones.

14. Descartar el sobrenadante y conservar el precipitado, secar el precipitado en un secador al vacío o en un lugar a temperatura ambiente.
15. Re-suspender el precipitado en H<sub>2</sub>O estéril o TE.
16. Nota: todos los reactivos se preparan con H<sub>2</sub>O estéril.

### Cuantificación de DNA en Nanodrop ND-1000 (Espectrofotometría)

Para tener una estimación de la cantidad de DNA genómico y verificar su calidad, se determina la densidad óptica a dos diferentes longitudes de onda 260nm y 280nm . Un cociente de densidad óptica 260/280 nm mayor de 1.8 significa que el ADN tiene una pureza adecuada; mientras que si es menor se considera que hay contaminación de la muestra, principalmente por sales o proteínas.



**Figura 19. Cuantificación de DNA por espectrofotometría.**

#### PROCEDIMIENTO:

- 1 Colocar 2 de H<sub>2</sub>O pura en el lector del Nanodrop 1000, cerrar el lector y realizar la asignación del elemento considerado blanco.



- Limpiar el lector con material apropiado (kim wipes) y depositar 2 de la muestra problema luego realizar la lectura de manera similar al blanco (ver ejemplo).

### **Verificación de la calidad del DNA**

La electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida es un método de separación, que permite identificar y purificar fragmentos de ácidos nucleicos, así mismo permite verificar su integridad.

#### **PROCEDIMIENTO:**

- Cargar ADN genómico en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1X.
- Mezclar la muestra de ADN 2 con 3  $\mu$ l buffer de carga 6X. Correr la electroforesis a 60V durante 1 hora y observar en el transiluminador.
- En las muestras con exceso de sal se observa una mayor refringencia que en aquellas con mejor calidad.
- Las muestras que presentan un barrido presentan degradación parcial proporcional a la fluorescencia de la banda de integridad del DNA genómico.

### **Procedimiento para secuenciación**

El proceso de secuenciación se llevo a cabo de la siguiente manera:

- PCR punto final para verificar el tamaño esperado del fragmento y presencia de amplificación inespecífica.
- Purificación del amplificado con Etanol.
- Reacción de secuenciación utilizando Big Dye versión 3.1.

- Purificación del producto de secuenciación con columnas *CentriSep (Princeton Separations. Applied Biosystems.)*.
- Secado de la muestra.
- Electroforesis capilar empleando POP6 (*Applied Biosystems, México*) como medio de soporte.
- Para visualizar la secuencia se utilizó el programa Chromas lite y posteriormente se alineó en diferentes bases de datos (BLAT, UCSC genome browser y BLAST, NCBI).

**Programa para Secuenciación.**

Paso	Tiempo	Temperatura
Desnaturalización inicial	3 minutos	95°C
Desnaturalización	10 segundos	96°C
Hibridación	20 segundos	55°C
Extensión	4 minutos	60°C
25 ciclos		

De acuerdo a metodología para extracción de DNA se determinara la presencia o ausencia de Mutación mitocondrial A10398G

Los datos se presentaran en tablas de contingencia

Por ser un estudio epidemiológico, los resultados se expresaran en porcentaje y se utilizarán medidas de tendencia central

### **CONSIDERACIONES ÉTICAS:**

- Todo paciente ingresado al estudio Firmará una Carta de Consentimiento Informado, en donde en forma escrita y en lenguaje no médico se le explicará sobre los objetivos del estudio (Anexo 1).
- El estudio se realizará de acuerdo a los Criterios de la Convención de Helsinki.
- Estudio aprobado por el Comité de Ética e Investigación

## **RECURSOS:**

### *RECURSOS HUMANOS:*

1. Personal del Servicio de Oncología Médica ( Residentes, Médicos Adscritos, Enfermería), que se encuentren en turno.
2. Personal del Servicio de Oncología Quirúrgica de la Sección de Tumores de Mama (Residentes y Médicos Adscritos en turno).
3. Personal de Laboratorio, para la toma de muestras y procesamiento de las mismas, en turno.
4. Personal del Servicio de Radiología e Imagen (Médicos Adscritos, Residentes, Enfermería y Técnicos en turno), para la realización, procesamiento e interpretación de los estudios de gabinete
5. Personal de Investigación con formación en Genética Humana

### *RECURSOS MATERIALES:*

1. El espacio del Consultorio Médico del Servicio de Oncología Médica para la Consulta del Paciente.
2. Secuenciador ABI 310 (Applied Biosystems)
3. Termociclador PCR tiempo real (LightCycler 480 II, ROCHE México)
4. Nanodrop ND-1000
5. Termociclador de gradiente (Biorad)
6. Placas de PCR tiempo real.

### *RECURSOS FINANCIEROS:*

1. El estudio se realizara con apoyo CONACYT 2009-C01-111696.

## RESULTADOS:

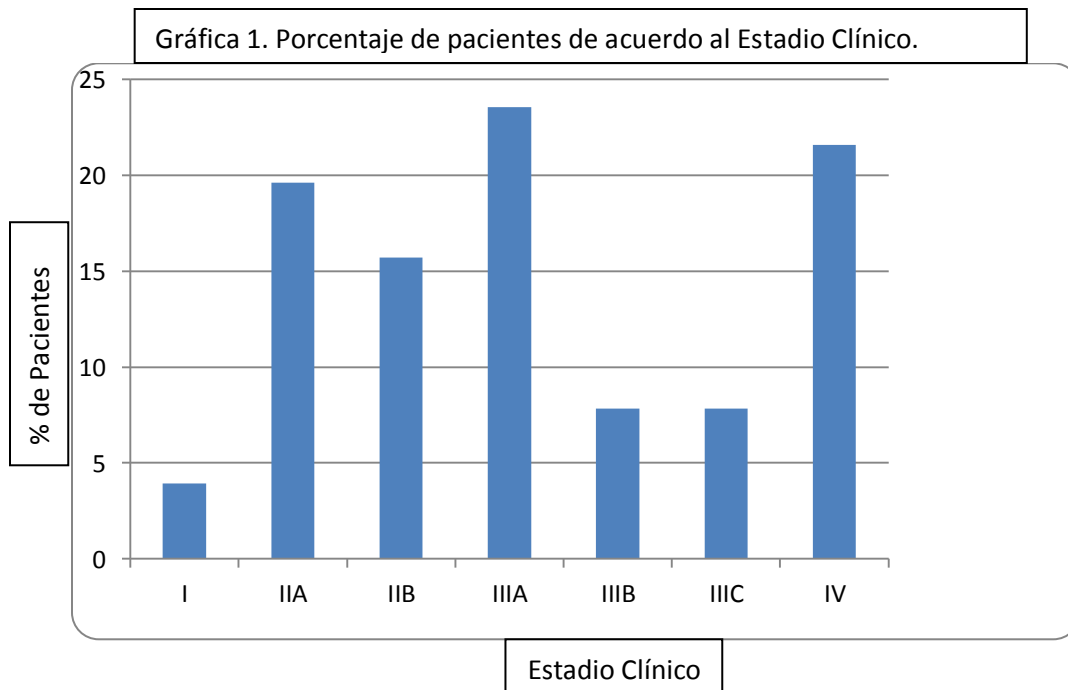
Se lograron ingresar, de manera secuencial, 51 pacientes (px) de raza mestiza, con cáncer de mama invasor, con una mediana de edad de 55 años (37-83 años). De éstas, 40 px (78.43%) fueron < 65 años y 11 px (21.57%) ≥ 65 años. Así mismo se encontraron las siguientes características:

### ESTADIO CLÍNICO:

La información respecto al estadio clínico se encuentra expresada en la tabla 1 y en la gráfica 1:

Estadio Clínico	% Pacientes	No. Pacientes
I	3.92	2
IIA	19.61	10
IIB	15.69	8
IIIA	23.53	12
IIIB	7.84	4
IIIC	7.84	4
IV	21.57	11

Tabla 1. Frecuencia de mujeres de acuerdo al estadio clínico.



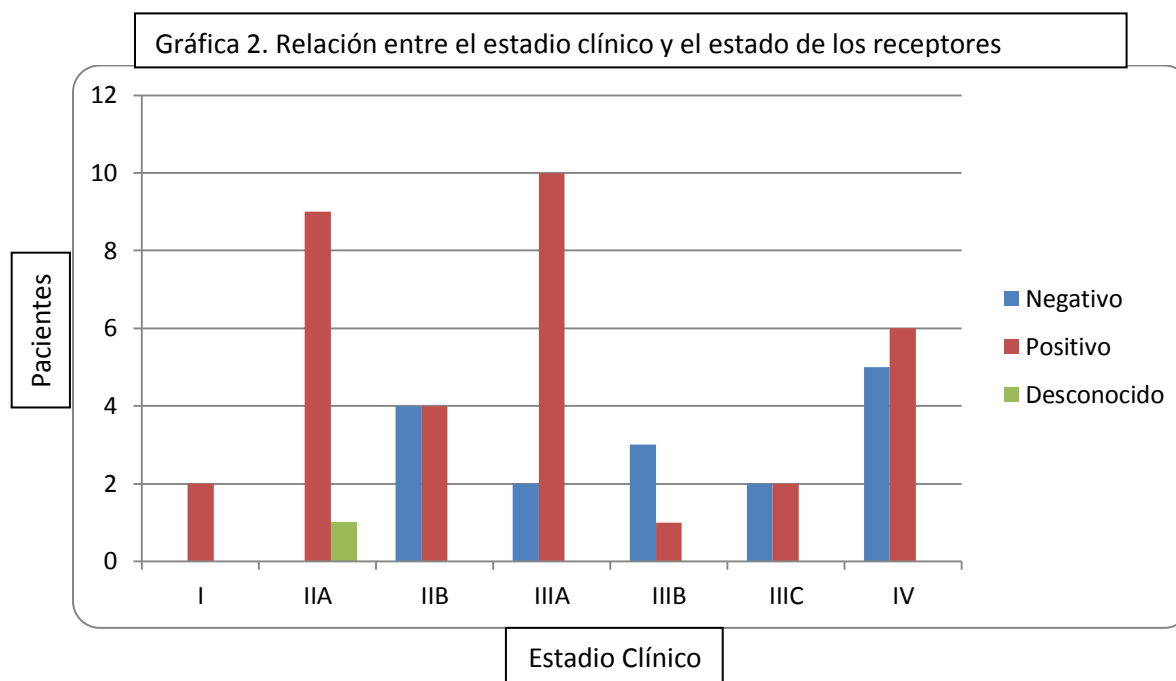
**RECEPTORES HORMONALES Y HER2/neu:**

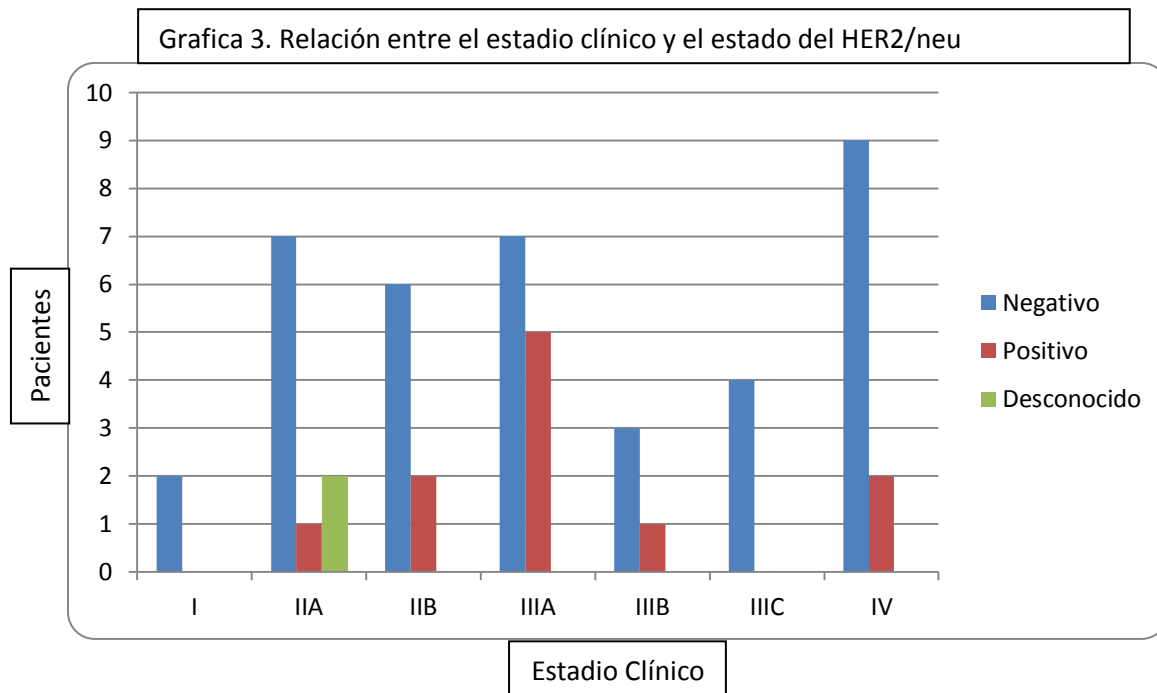
La información respecto al estado de expresión de los receptores hormonales y receptor HER2/neu, se encuentra expresada en la tabla 2 y en las gráficas 2 y 3:

Tabla 2. Frecuencia de acuerdo al estado de los receptores hormonales y del Her2/neu.

Estado	Receptores Hormonales		Her2/neu	
	No. Pacientes	%	No. Pacientes	%
Negativo	16	31.37	38	74.51
Positivo	34	66.67	11	21.57
D	1	1.96	2	3.92
Total	51	100	51	100

%; Porcentaje, D: Desconocido.





**SEGUNDOS PRIMARIOS:**

Se encontró que 4 pacientes (7.84%) tenían un antecedente de cáncer previo, de las cuales 2 pacientes (3.92%) el primario fue cáncer cérvico-uterino y 2 pacientes (3.92%) cáncer de mama contralateral.

**FAMILIARES CON CÁNCER DE MAMA:**

Quince pacientes (29.4%) tenían un antecedente de cáncer de mama en algún familiar, la distribución de acuerdo al familiar se encuentra en la tabla 3:

Familiar	No Pacientes	%
Madre	1	1.96
Hermana	6	11.76
Tía	4	7.84
Abuela	1	1.96
Prima	3	5.88
Total	15	29.41%

Tabla 3. Distribución de pacientes con Ca de mama.

También se encontró que un 13.72% (7 pacientes) eran familiares en primer grado (madre o hermana).

**FAMILIARES CON ANTECEDENTE DE CÁNCER:**

Con respecto al antecedente de uno o más familiares con algún tipo de cáncer, excepto mama, se resume en las tablas 4 y 5:

Tabla 4. Familiares con antecedente de otro tipo de cáncer, excepto mama		
Antecedente	No. Paciente	%
Positivo	20	39.22
Negativo	30	58.82
Desconoce	1	1.96
Total	51	100

Tabla 5. Familiar afectado con otro tipo de cáncer, excepto mama		
Familiar	No. Paciente	%
Madre	3	5.88
Padre	6	11.76
Hermano(a)	3	5.88
Abuelo(a)	3	5.88
Tio(a)	3	5.88
Primo(a)	2	3.92

Se puede observar que aproximadamente el 60% de los familiares con antecedente de cáncer distinto a mama (12 pacientes) son en primer grado (tabla 6).

Tabla 6. Frecuencia de los tipos de cáncer presentados por los familiares de las pacientes con cáncer de mama		
Cáncer	Número	%
Ninguno	30	58.82
CaCU	4	7.84
Próstata	4	7.84
Colon	2	3.92
Hepatocarcinoma	2	3.92
Endometrio	2	3.92
Ovario	1	1.96
Otros	5	9.82
Desconoce	1	1.96
Total	51	100

**ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS (tabla 7):**

En cuanto a tabaquismo, etilismo, Diabetes Mellitus 2 e Hipertensión arterial, se encontraron los siguientes datos:



	Tabaquismo	Etilismo	DM2	HAS
Positivo	29.41%	17.65%	17.65%	25.49%
Negativo	70.59%	82.35%	82.35%	74.51%
Total	100	100	100	100

Tabla 7. Características generales: Antecedentes personales no patológicos.

#### ANTECEDENTES GINECOBSTETRICOS:

Los datos más relevantes se expresan a en la tabla 8:

Tabla 8. Características generales: Antecedentes ginecobstétricos.

Variable	Medianas	Rango
Menarca	13 años	8 a 18 años
Gesta	3 gestas	0 a 8 gestas
TRH	24 meses	12 a 36 meses
Edad 1er embarazo	24 años	15 a 37 años
Lactancia acumulada	9.5 meses	0 a 120 meses
Menopausia	49 años	29-55 años

TRH: Terapia de reemplazo hormonal.

Desglosando por factores de riesgo encontramos lo siguiente (tablas 9 a 13):

Tabla 9. Frecuencia de pacientes de acuerdo a lactancia materna.

Lactancia	No. Paciente	%
No Lactó	16	33.33
Sí y $\leq$ 12 meses	13	27.08
Sí y $>$ 12 meses	19	39.58
Total	48	100

Se desconoce la información de 3 pacientes, por lo que para fines de esta variable se eliminaron.

Tabla 10. Frecuencia de pacientes de acuerdo a la edad al primer embarazo

Edad 1er embarazo	No. Paciente	%
$\leq$ 30 años	41	80.39
$>$ 30 años	2	3.92
Nulíparas	4	7.84
Desconoce	4	7.84
Total	51	100

Tabla 11. Frecuencia de pacientes de acuerdo a uso de terapia de reemplazo hormonal.

TRH	No. Paciente	%
$\leq$ 12 meses	3	42.9
12-24 meses	3	42.9
$>$ 24 meses	1	14.3
Total	7	100

Tabla 12. Frecuencia de pacientes de acuerdo a edad de la menarca.

Menarca	No. Paciente	%
≤ 12 años	8	15.69.00%
> 12 años	43	84.31
Total	51	100

Tabla 13. Frecuencia de pacientes de acuerdo al estado menopausico.

Menopausia	No. Paciente	%
≤ 52 años	29	56.86
> 52 años	10	19.61
Premenopáusica	11	21.57
Desconoce	1	1.96
Total	51	100

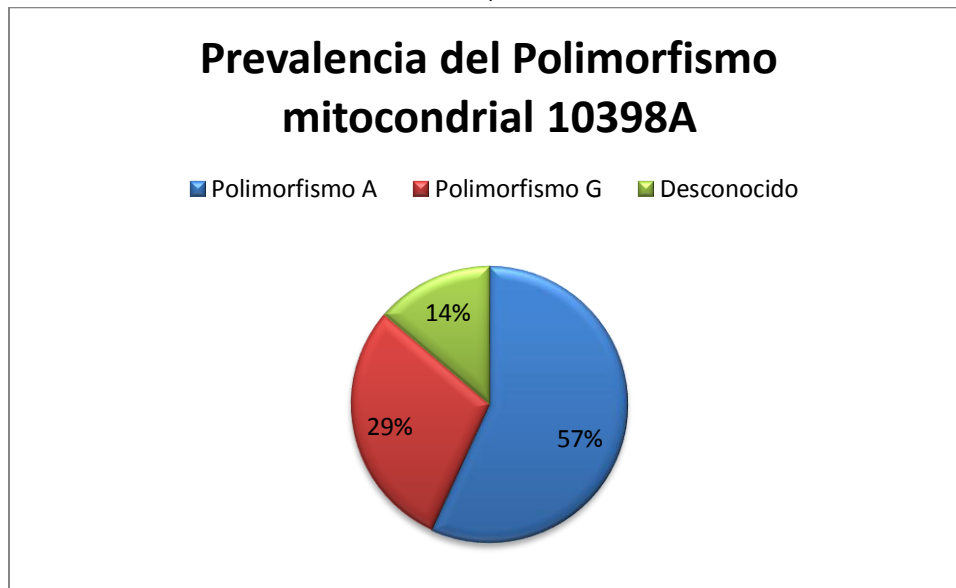
**POLIMORFISMO MITOCONRIAL 10938A:**

Se obtuvieron 51 muestras de pacientes con cáncer de mama del CMN 20 de Noviembre para análisis por PCR del polimorfismo mitocondrial 10398A y 10398G.

Se excluyeron para el análisis 7 pacientes por mala calidad en el ADN, lo que lo fue imposible realizar PCR en esas muestras, los resultados se muestran en la tabla 14, gráfica 3 y figura (1):

	No.	%
Polimorfismo A	29	56.86
Polimorfismo G	15	29.41
Desconocido	7	13.73

Tabla 14. Frecuencia de polimorfismo A y G en pacientes con Ca de mama



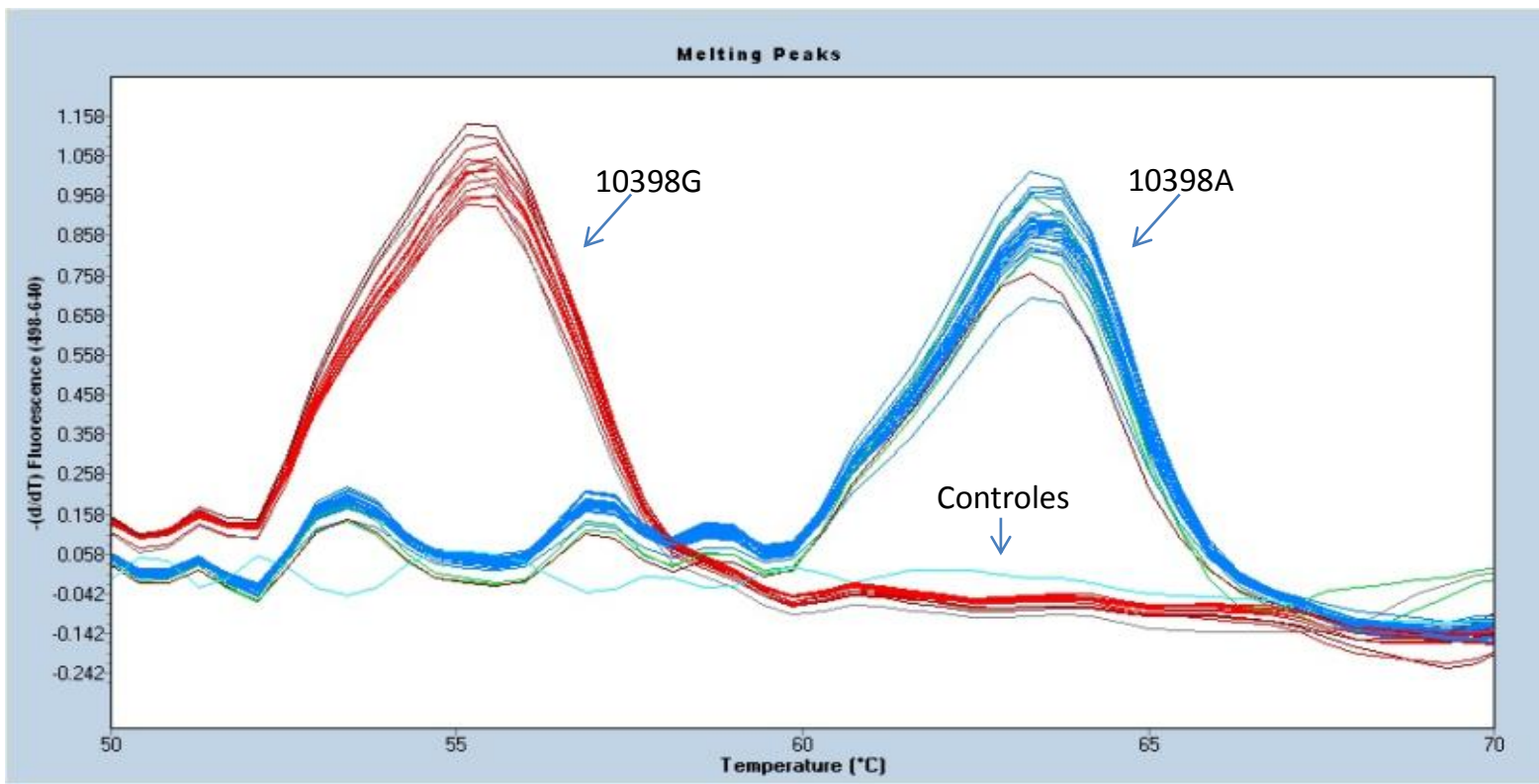
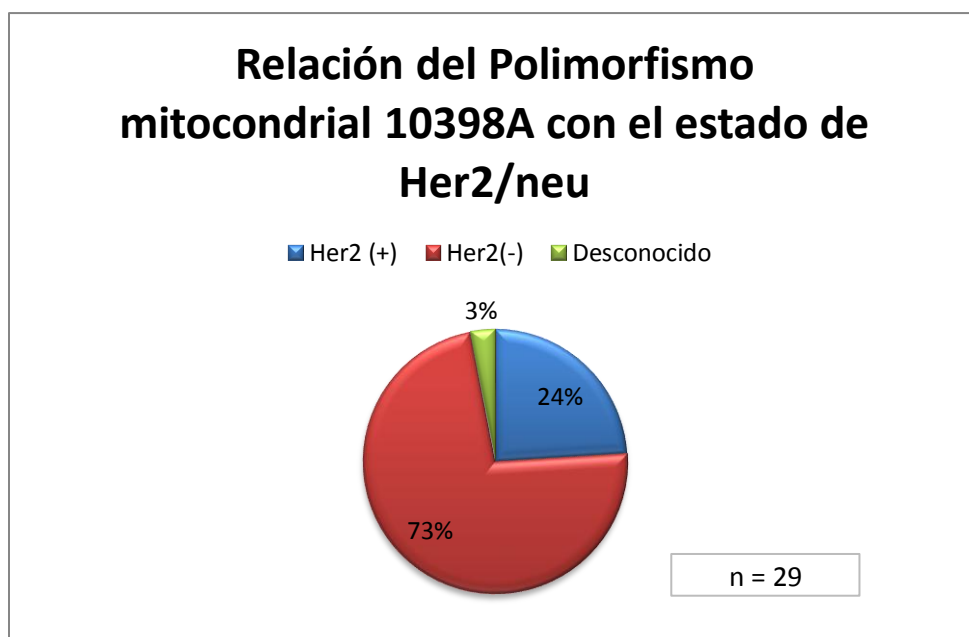


Figura 1: Amplificación del polimorfismo mitocondrial 10398A y G.

**RELACIÓN DEL POLIMORFISMO 10398A CON EL ESTADO DEL RECEPTOR HER/2NEU Y RECEPTORES HORMONALES:**

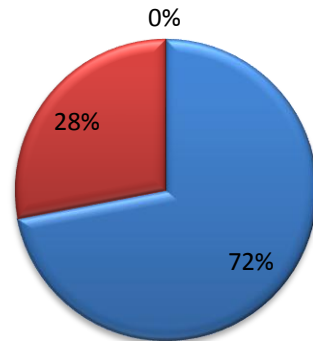
De 29 pacientes positivas para el polimorfismo mitocondrial 10398A, se encontró que más de la mitad no sobreexpresaba el receptor Her2/neu (73%) y el 72% de las mismas tenían receptores hormonales positivos, guardando prácticamente la misma relación que la población general (gráficas 4 y 5 respectivamente).



Gráfica 4

## Relación del Polimorfismo mitocondrial 10398A con el estado de los Receptores Hormonales

■ RH (+) ■ RH (-) ■ Desconocido



n = 29

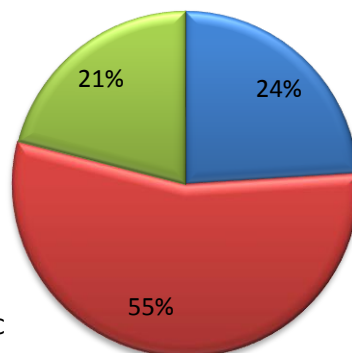
Gráfica 5.

### RELACION DEL POLIMORFISMO MITOCONDRIAL 10398A CON EL ESTADIO CLÍNICO:

Acorde a nuestro análisis, el polimorfismo estuvo presente, en orden de frecuencia, en el 55% de las mujeres con enfermedad localmente avanzada, 24% en enfermedad metastásica y en un 21% en etapas tempranas (Gráfica 6).

## Relación del Polimorfismo mitocondrial 10398A con el Estado Clínico

■ Etapa Temprana ■ Localmente Avanzado ■ Metastásico



Etapa Temprana: EC I - IIA  
Localmente Avanzado: EC IIB - IIIC  
Metastásico: EC IV

n = 29

Gráfica 6

## DISCUSIÓN:

En este trabajo de investigación logramos obtener una muestra de las pacientes con cáncer de mama del CMN 20 de noviembre desde agosto del 2011 a enero del 2012 y sus características epidemiológicas. El 78.5% de las pacientes fueron mayores de 65 años. Los estadios clínicos más frecuentes fueron localmente avanzados (54%) ó metastásicos (21%), llegando, de manera conjunta, hasta 75% de nuestra población a comparación de Estados Unidos de América en el que la enfermedad metastásica representa únicamente del 5-10%. Cabe recalcar que puede existir un sesgo de muestreo ya que parte de la muestra se recabó en la sala de quimioterapia.

Al igual que lo reportado en la literatura internacional, alrededor del 60% de los tumores tuvieron receptores hormonales positivos y 21% Her2/neu positivo, así mismo, éstas últimas presentaron más frecuentemente estadios clínicos avanzados al diagnóstico.

En cuanto a los factores de riesgo ginecológicos, la mayor parte de nuestras pacientes no los tenía, siendo que más del 80% de las pacientes fue madre antes de los 30 años, no usaron tratamientos de reemplazo hormonal, su menarca fue después de los 12 años y su menopausia antes de los 52 años. Por el contrario únicamente el 40% de las pacientes tuvieron el factor protector de la lactancia mayor de 12 meses.

Nuestra prevalencia de segundos primarios fue de 7.84% la cual coincide con los reportes internacionales (3.7-9.2%).

En cuanto a los factores familiares llama la atención que prácticamente el 40% de las pacientes contaba con un antecedente familiar de cáncer, de los cuales el 60% fueron familiares de primer grado. Los tipos de tumores más frecuentes fueron próstata y CaCU, lo cual coincide con la incidencia de los registros epidemiológicos de neoplasias en México, siendo estos tipos de tumores el primero en hombres y el segundo en mujeres respectivamente. Además hasta el 29.4% de los familiares tuvieron cáncer de mama y de éstos, el 13.7% fueron de primer grado.

En cuanto al polimorfismo mitocondrial 10398, de 4 haplotipos existentes, solo se identificaron 2 en nuestras pacientes con cáncer de mama, el 10398A y el 10398G, encontrándose de manera más frecuente el tipo A en un 57% (29 pacientes), y en un 29% (15 pacientes) el tipo G. Únicamente se correlacionó el tipo A, pues éste es el que está documentado como factor de riesgo para cáncer de mama en población afro-americana.

En comparación con las afro-americanas, podemos concluir que nuestros resultados son distintos, ya que en el estudio de La Universidad de Carolina, la frecuencia para el polimorfismo mitocondrial tipo A fue de 13% contra un 57% de nuestra población y el tipo G fue de 85% contra un 29% de nuestra población.

Así mismo, pareciera que nuestros resultados son más similares con la población caucásica, en donde la frecuencia reportada en el estudio de la Universidad de Carolina fue para el tipo A de 80% contra un 57% de nuestra población y del 20% para el tipo G contra un 29% de nuestra población.

En cuanto al estado de los receptores hormonales y Her2/neu, no hay alguna característica importante que destacar, ya que, la relación del polimorfismo 10398A el cual está relacionado con aumento en el riesgo de cáncer de mama en afro-americanas, no varió con respecto a la epidemiología ya conocida en la población general con cáncer de mama.

La etapa clínica y el polimorfismo 10398A, parecen estar asociadas a etapas más avanzadas, sin embargo, la mayoría de nuestra población se encuentra en etapas avanzadas y no se realizó ningún estudio estadístico para verificar la relación.

Por desgracia en este momento no contamos con las pruebas para localizar alteraciones en BRCA1 y BRCA2 para identificar a las pacientes que pudieran tener Ca de mama de tipo hereditario. Por otro lado, esto podría hablarnos también de la correlación con factores hereditarios distintos a los ya descritos como la presencia de polimorfismos mitocondriales.

Este estudio es descriptivo, por lo que se requiere de una población de controles sanos para poder establecer una relación entre la presencia del polimorfismo y el riesgo de cáncer de mama. Actualmente ya se encuentra corriendo dicho estudio y se esperan sus resultados en poco tiempo.

## **CONCLUSIÓN:**

La epidemiología del cáncer de mama en nuestra población, no pareciera diferir de manera importante a lo descrito en la literatura internacional, salvo en la etapa clínica, donde consideramos es necesario concientizar a las mujeres sobre la enfermedad y llevar los estudios de tamizaje a todos los estratos socioeconómicos.

La frecuencia del polimorfismo mitocondrial 10398A, parece diferir de manera importante con lo reportado para la población afro-americana, en la que se encontró como un factor de riesgo para cáncer de mama. Sin embargo, es imprescindible correlacionar nuestros resultados con controles sanos y establecer o descartar una relación de peso.



**Anexo 1**  
**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MUJERES CON CÁNCER DE MAMA**

México, D.F., a \_\_\_\_\_

Por \_\_\_\_\_ medio \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ la \_\_\_\_\_ presente \_\_\_\_\_ yo,

autorizo mi participación en el proyecto de investigación titulado **“Prevalencia de Polimorfismo Mitocondrial (10398A) en pacientes con Cáncer de Mama del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre”**

El objetivo de este estudio es conocer mediante un estudio realizado en un laboratorio acerca de un gen el cual tiene el en el material de la herencia, una modificación que pudiera condicionar la presencia de cáncer de mama.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en: **saber que no realizará gasto alguno, que no recibirá recompensa económica por ingresar y que su única responsabilidad al ingresar al estudio es responder las preguntas que normalmente realizamos, independientemente de si se está o no en un proyecto de investigación y una toma de una muestra única de 5 ml de sangre.**

**Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes y molestias de mi participación en el estudio, que son los siguientes:**

**Riesgos y molestias:**

- a) **Por la toma de sangre: malestar y dolor, formación de hematoma o morete en el sitio del piquete de la vena.**
- b) **Por la extracción de sangre: ninguno**

Entiendo que conservo el derecho de retirarme o retirar mi muestra biológica del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo en el Instituto. Asimismo, se me ha informado si autorizo que mi muestra pueda ser utilizada en futuras investigaciones relacionados con el cáncer, así como será almacenada a -20°C durante un período de 15 años en la División de Medicina Genómica, en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE, México, D.F., a partir de la toma de la muestra, y que podría ser utilizada para otros estudios; pasado este tiempo será desechada.

El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder cualquier pregunta y aclarar las dudas que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con su tratamiento.



El investigador principal ha dado seguridades de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma absolutamente confidencial. **Para cumplir la anterior, el investigador utilizará para la creación de la base de datos (que tendrán mi información clínica, así como las respuestas del cuestionario acerca de mis datos que se me aplicará), número de folio (NO empleará mi nombre) para identificarme y de esa forma conservar mi anonimato.**

**Datos de la investigadora principal a los cuales puede comunicarse en caso de dudas o preguntas relacionadas con el estudio: Dr. Abraham Ruiz García y Dra. Aura A Erazo Valle Solís, Teléfono de contacto: 52005003 Ext. 14436. Domicilio de contacto: Félix Cuevas #540, Col. Del Valle, Del. Benito Juárez, México, D.F.; División de Medicina Genómica, 2do. Piso del edificio D en la Subdirección de Enseñanza e Investigación, Calle San Lorenzo 502, esquina Av. Coyoacán, Col. Del Valle, Delegación Benito Juárez, C.P. 03100. Preesidente del Comité de Ética Dr Abel Archundia García, tel 52005003, ext 14622**

**Paciente:**

**Médico:**

---

Nombre y Firma  
Teléfono de Contacto: \_\_\_\_\_

---

Nombre y Firma del Médico Tratante o Investigador  
Teléfono de contacto 52005003 Ext. 14448  
\*

**Testigo 1:**

**Testigo 2:**

---

Nombre y Firma  
Teléfono de Contacto: \_\_\_\_\_

---

Nombre y Firma  
Teléfono de Contacto: \_\_\_\_\_

**\*Investigadores Principales:** Dra Aura A Erazo Valle Solís, Dr. Abraham Ruiz García,  
Teléfono de contacto: 52005003 Ext. 14436. Domicilio de contacto: Félix Cuevas #540, Col. Del Valle, Del. Benito Juárez, México, D.F.

**ANEXO 2: HOJA RECOLECCIÓN DE DATOS**

Nombre \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_  
 Siglas \_\_\_\_\_  
 No Paciente: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_  
 Teléfono: \_\_\_\_\_ Talla: \_\_\_\_\_  
 Fecha de Nacimiento: \_\_\_\_\_ Fecha de Ingreso al proyecto: \_\_\_\_\_  
 Superficie Corporal: \_\_\_\_\_

Diagnóstico de Cáncer previo:	SI NO	Diagnóstico de Cáncer de Mama:	SI NO
Etapa (TNM)			
Familiares con cáncer de Mama Tía Abuela	SI	NO	Quién. Madre Hermana
Familiares con diagnóstico de otro tipo de cáncer	SI	NO	
Nació en México:	SI	NO	
Padres Nacionalidad Mexicana	SI	NO	
Abuelos Nacionalidad Mexicana	SI	NO	
Antecedentes de importancia:			
Hereditarios y Familiares:			
Personales no Patológicos			
Personales Patologicos			
Ginecoobstetricos			

Comentarios: \_\_\_\_\_


---

Nombre y Firma del recolector de datos, y fecha

## Bibliografía

- 1.- <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>
- 2.- <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=484>
- 3- Ren-Kui Bai,<sup>1</sup> Suzanne M. Leal,<sup>1</sup> Daniel Covarrubias,<sup>1,2</sup> Aiyi Liu,<sup>3</sup> and Lee-Jun C. Wong<sup>1</sup> Mitochondrial Genetic Background Modifies Breast Cancer Risk *Cancer Res* 2007; 67: (10). May 15, 2007
- 4- Jeffrey A. Canter,<sup>1</sup> Asha R. Kallianpur,<sup>2</sup> Fritz F. Parl,<sup>3</sup> and Robert C. Millikan<sup>4</sup> Mitochondrial DNA G10398A Polymorphism and Invasive Breast Cancer in African-American Women *Cancer Res* 2005; 65: (17). September 1, 2005
5. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003;552:335–44.
6. Carelli V, Giordano C, d'Amati G. Pathogenic expression of homoplasmic mtDNA mutations needs a complex nuclear-mitochondrial interaction. *Trends Genet* 2003;19:257–62.
7. Carrieri G, Bonafe M, De Luca M, et al. Mitochondrial DNA haplogroups and APOE4 allele are non-independent variables in sporadic Alzheimer's disease. *Hum Genet* 2001;108:194–8.
8. Mukae S, Aoki S, Itoh S, et al. Mitochondrial 5178A/C genotype is associated with acute myocardial infarction. *Circ J* 2003;67:16–20.