



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Papel de las isoformas $\Delta 40p53$ y $\Delta 133p53$ sobre el
metabolismo glucolítico y mitocondrial de células
cancerosas**

TESIS

Que presenta:

M. en C. Eduardo Domínguez de la Cruz

Para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directores de tesis:

Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno. CINVESTAV

Dr. Alejandro Manuel García Carrancá. UNAM-INCan

Ciudad de México

Agosto, 2020

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 1 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno y el Dr. Alejandro Manuel García Carrancá y la asesoría de la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, el Dr. Luis Marat Álvarez Salas, el Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe y el Dr. Normand García Hernández.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al PNPC por el otorgamiento de la beca 485179, ya que gracias a esta se logró el desarrollo y culminación de este proyecto.

Dedicatoria

Yo no soy quien soy únicamente por mis genes, sino porque tengo el privilegio de contar con un padre y una madre que me han educado de cierta forma que me ha permitido llegar a donde un día imaginé.

Este trabajo se lo dedico completamente a mi familia, porque en ellos pude encontrar la fortaleza que necesitaba en los peores momentos, solo con el hecho de estar a mi lado y hacerme reír con las clásicas ocurrencias de todos los días me recargaban de energía para poder seguir adelante. Asimismo, siempre me han motivado a seguir mi camino en la ciencia a pesar de que muchas veces no comprendían lo que hacía y cada vez que me decían que se sentían orgullosos de mí me inspiraban a ser mejor día con día.

También quiero dedicar este trabajo a dos grandes amigas y mujeres científicas, quienes desafortunadamente ya no están conmigo. Porque las admiro enormemente en el quehacer científico por su gran dedicación y pasión haciendo ciencia día con día; además de su gran calidad humana y su amistad. Una dedicatoria especial a Ruth y Jean. QEPD.

Agradecimientos

A la Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno, por aceptarme desde mi ingreso a la maestría en su grupo de trabajo. Porque siempre me dejó proponer y desarrollar los proyectos que realicé en su laboratorio. Sobre todo por guiarme y enseñarme cómo funciona la ciencia, desde la elaboración de proyectos, su ejecución y la entrega de los resultados; además de que siempre se preocupó por conseguirme apoyos para que pudiera concluir con éxito el doctorado. En pocas palabras, me enseñó a ser un investigador. Por todo esto quiero expresarle mis más sinceros agradecimientos.

Al Dr. Alejandro Manuel García Carrancá, por aceptar colaborar en este proyecto y codirigir mi tesis de doctorado. Por todo su apoyo científico y técnico y sus sabios consejos que me permitieron desarrollar con éxito el presente trabajo.

A mis asesores, la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, Dr. Luis Marat Álvarez Salas, Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe y el Dr. Normand García Hernández. Por sus pertinentes consejos y cuestionamientos durante el desarrollo del presente proyecto, que me permitieron redirigirlo y mejorarlo hasta su conclusión.

Al Dr. Carlos López Otín, quien participó como mi asesor durante casi todo el desarrollo de presente trabajo. Le agradezco por aceptar gratamente ser mi asesor, y durante ese tiempo me brindó todo su apoyo y me dio excelentes recomendaciones que me permitieron poder concluir el presente proyecto. Además porque lo admiro como ser humano y como científico, espero algún día poder colaborar con él en calidad de colegas.

A mis amigos de generación: Mayram, Sandy, Rodri, Cesar, Alex, Rey e Isma. Porque desde los inicios de la maestría hasta el término del doctorado han sido una segunda familia con la que pasé de los mejores momentos de mi vida, así como de los peores, pero juntos hemos logramos superar todas las adversidades. Porque sin ellos me hubiera sido muy difícil poder llegar al final de esta grandiosa aventura en el CINVESTAV.

A Rodrigo Quezada. Porque que más que amigo, es un hermano más. Porque se acercó a mí en una de las etapas más difíciles de mi vida. Y desde ese momento siempre ha estado a mi lado brindándome su más sincera amistad y apoyo incondicional en todos los aspectos.

A Sandy y Pablo, porque han sido unos excelentes amigos, y el vivir con ellos fue una grata experiencia. Juntos formamos una gran hermandad y siempre procuramos nuestro mutuo bienestar.

A Mayram, mi gran confidente, quien conoció mis más íntimos secretos. Gracias por todas esas gratas noches de plática con cerveza y kilos y kilos de alitas, y no importa a donde nos lleve la vida, siempre será mi gran amiga.

A mi amiga Tere. Porque desde que nos conocimos congeniamos perfectamente a nivel personal. Porque me recordó que el aspecto espiritual en el ser es muy importante para tener una vida plena. Porque también estuvo a mi lado en uno de los momentos más difíciles de mi vida a pesar de que se encontraba a kilómetros de distancia, y gracias a sus palabras pude comprender y aceptar muchas cosas. Pero también muchas gracias por los excelentes momentos de diversión, tristeza y reflexión en aquellas tardes en que solo íbamos por una y al final perdíamos la cuenta.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Tere, Ashael, Angie, Gerardo, Heriberto, Migue, Cesar, y Karla. Por todo su apoyo durante la realización de este proyecto y por todos los buenos momentos compartidos a lo largo de mi estancia en el laboratorio y fuera del él.

A mis grandes amigos de la FES Zaragoza, Tona, Aline y Rafa. Porque seguimos siendo grandes amigos a pesar del tiempo transcurrido y seguimos estando juntos en los mejores y peores momentos de nuestras vidas.

A Hebert Cadena García por el apoyo técnico brindado durante la realización del presente proyecto de investigación, además de su invaluable amistad.

A Guadalupe Aguilar González, responsable de la Unidad de Ácidos nucleicos, por su indispensable apoyo técnico para la obtención de las secuencias utilizadas en el presente proyecto.

A Gabriela Mora Macías, por todo su oportuno y eficiente apoyo administrativo que me brindó desde mi ingreso al departamento de Genética y Biología Molecular.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por el otorgamiento de la beca de tesis 18BTD0020 y a la fundación Carlos Slim por la beca de Excelencia en Enfermería, Medicina y Nutrición con el número de folio S160015833.

Finalmente al CINVESTAV, porque su paso por él fue un largo y duro camino, sobre todo al final del doctorado. Ha sido uno de los mayores retos y lecciones de mi vida tanto a nivel profesional como personal. Por ser el mejor centro de investigación donde tuve la dicha de formarme. Además, me dejó una nueva familia, que aunque la vida nos lleve por caminos separados en busca de nuevos retos y oportunidades, mis grandes amigos siempre estarán en mi mente y mi corazón.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Características del cáncer.....	3
1.2 Reprogramación metabólica de células cancerosas.....	4
1.3 La proteína supresora de tumor p53 y efecto Warburg.....	5
1.4 Isoformas de p53 y sus funciones.....	8
1.4.1 Isoformas p53 β y p53 γ	8
1.4.2 Isoformas Δ 40p53 α , β y γ	8
1.4.3 Isoformas Δ 133p53 α , β y γ	9
1.4.5 Isoformas Δ 160p53 α , β y γ	11
1.5 Efecto del número de copias del mtDNA con el desarrollo de cáncer.....	12
1.6 Efecto de haplogrupos mitocondriales con el desarrollo de cáncer.....	13
II. JUSTIFICACIÓN.....	15
III. HIPÓTESIS.....	15
IV. OBJETIVOS.....	16
4.1 General.....	16
4.2 Particulares.....	16
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	17
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
6.1 Cultivo celular.....	18
6.2 Muestras de tejido de pacientes con cáncer de mama.....	18
6.3 Características clínicas de las pacientes con cáncer de mama.....	19
6.4 Transfección.....	19
6.5 Extracción de proteínas e inmunoblot.....	21
6.6 Ensayo de consumo de glucosa.....	21
6.7 Ensayo de secreción de lactato.....	22
6.8 Extracción de DNA.....	22
6.9 Amplificación de la región D-loop por PCR y secuenciación.....	22
6.10 Determinación de haplogrupos mitocondriales.....	22

6.11 Cuantificación del número de copias del mtDNA.....	23
6.12 Análisis estadístico	23
VII. RESULTADOS	24
7.1 Transfección y expresión de las isoformas WTp53, $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ en células H1299.....	24
7.2 Evaluación del efecto de las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ sobre el consumo de glucosa en células H1299	25
7.3 Evaluación del efecto de las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ sobre la excreción de lactato en células H1299	27
7.4 Evaluación de los niveles de expresión de proteínas involucradas en el metabolismo celular en células H1299	29
7.5 Evaluación del número de copias de mtDNA en células H1299	31
7.6 Identificación de isoformas de la proteína p53 en tejido provenientes de pacientes con cáncer de mama.....	32
7.7 Asociación del número de copias del mtDNA con las características clínicas y los haplogrupos mitocondriales.....	33
VIII. DISCUSIÓN	35
IX. CONCLUSIONES.....	40
X. PERSPECTIVAS.....	42
XI. REFERENCIAS.....	43
XII. ANEXO.....	53
12.1 Expression of the $\Delta 40p53\alpha$ and $\Delta 133p53\alpha$ isoforms are associated with age, body mass index and receptor status in Mexican women with breast cancer	53
12.2 Reduced mitochondrial DNA copy number is associated with the haplogroup, and some clinical features of breast cancer in Mexican patients	54
12.3 Participación en otros proyectos.	62

RESUMEN

En la actualidad se han descrito distintas alteraciones en la fisiología celular responsables de la generación de un genotipo y fenotipo canceroso, entre las que se encuentra la reprogramación del metabolismo energético celular. Recientemente se ha reportado que la proteína WTp53 puede revertir la reprogramación metabólica en células cancerosas al regular distintos genes involucrados en este proceso, tales como: *SLC2A1* (GLUT1), *SLC2A4* (GLUT4), *SLC16A1* (MCT1), *SLC16A4* (MCT4), *ENO-1A*, *PDK2*, *PDH* y *AIFM1*; además de la regulación del contenido del DNA mitocondrial (mtDNA). Asimismo, se han descrito 12 isoformas de la proteína p53 (WTp53 o p53 α , p53 β , p53 γ , Δ 40p53 α , Δ 40p53 β , Δ 40p53 γ , Δ 133p53 α , Δ 133p53 β , Δ 133p53 γ , Δ 160p53 α , Δ 160p53 β , Δ 160p53 γ); mismas que han sido reportadas y asociadas con procesos carcinogénicos. Sin embargo, hasta el momento no existe evidencia del papel que juegan estas isoformas sobre el metabolismo energético o si se encuentran expresadas en tejidos tumorales de individuos mexicanos. Por tal motivo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar *in vitro* el papel que juegan las isoformas Δ 40p53 α , Δ 133p53 α sobre el metabolismo energético; así como un estudio piloto sobre la asociación de estas isoformas y el número de copias del mtDNA con las características clínicas y haplogrupos mitocondriales de una población de mujeres mexicanas con cáncer de mama.

El efecto de las isoformas sobre el metabolismo energético se evaluó mediante el estudio de la expresión de las isoformas Δ 40p53 α y Δ 133p53 α en la línea celular H1299. Además, se midieron los niveles de glucosa y lactato por colorimetría; los niveles proteicos de GLUT1, GLUT4, MCT1, MCT4, ENO-1A, PDK2, PDH-E1 α , AIF por inmunoblot, y el número de copias del mtDNA por qPCR en tiempo real. Los resultados mostraron que la isoforma Δ 40p53 α disminuye el consumo de glucosa al disminuir la expresión de GLUT1, además reduce la expresión de MCT1. En relación a la isoforma Δ 133p53 α , no se observó ningún efecto en la regulación de los metabolitos, proteínas, ni el número de copias del mtDNA. Por otra parte, la expresión de Δ 40p53 α fue menor en tejido normal adyacente (TNA) en comparación al tejido de cáncer de mama (TCM); contrariamente, la expresión de Δ 133p53 α es más alta en TCM en comparación al TNA, además de asociarse con la edad y el IMC. También se observó una disminución en el contenido del mtDNA en TCM comparado con TNA en mujeres mayores a 50 años, con un IMC elevado y con cáncer ductal invasivo. Finalmente, después de secuenciar la región D-loop del mtDNA y la cuantificación del mtDNA, se detectó una disminución en el contenido del mtDNA en muestras con haplogrupos B2 y C1 y en muestras que contienen las variantes A249del, A290del, A291del y C16327T; por el contrario, se observó un aumento del contenido del mtDNA en muestras con las variantes C16111T, G16319A y T16362C.

ABSTRACT

Currently, different alterations in cellular physiology essential for the generation of a cancerous phenotype are well defined, including reprogramming of cellular energy metabolism. It has recently been reported that the WTp53 protein can reverse metabolic reprogramming in cancer cells by regulating different genes involved in this process; such as *SLC2A1* (GLUT1), *SLC2A4* (GLUT4), *SLC16A1* (MCT1), *SLC16A4* (MCT4), *ENO-1A*, *PDK2*, *PDH* and *AIFM1*; in addition to the regulation of the mitochondrial DNA (mtDNA) content. On the other hand, 12 isoforms of the p53 protein have been described (WTp53 or p53 α , p53 β , p53 γ , Δ 40p53 α , Δ 40p53 β , Δ 40p53 γ , Δ 133p53 α , Δ 133p53 β , Δ 133p53 γ , Δ 160p53 α , Δ 160p53 β , Δ 160p53 γ), which have been reported and 1q associated with some carcinogenic processes. However, so far there is no evidence of the role that these isoforms play on cellular energy metabolism or if they are expressed in tumor tissues of Mexican individuals. For this reason, the objective of the present work was to evaluate *in vitro* the role that the Δ 40p53 α , Δ 133p53 α isoforms play on cellular energy metabolism; as well as a pilot association study of these isoforms and mtDNA content with clinical features and mitochondrial haplogroups in a Mexican population of women with breast cancer.

The evaluation of the effect of isoforms on energy metabolism was evaluated by studying expression of the Δ 40p53 α and Δ 133p53 α isoforms in the H1299 cell line. This was done by measuring glucose and lactate levels by colorimetry; protein levels of GLUT1, GLUT4, MCT1, MCT4, ENO-1A, PDK2, PDH-E1 α , and AIF by immunoblot and mtDNA copy number by qPCR in real time. The results showed that the Δ 40p53 isoform decreases glucose consumption by decreasing GLUT1 expression, and also reduces MCT1 expression. While the Δ 133p53 α isoform had no effect on the regulation of metabolites, proteins, or mtDNA content. On the other hand, by immunoblot assays was observed that the expression of Δ 40p53 α is lower in normal adjacent tissue (NAT) compared to breast cancer tissue (BCT). On the contrary, the expression of Δ 133p53 α is higher in BCT compared to NAT, in addition to being associated with high age and BMI. Furthermore, a decrease in the mtDNA content in BCT was found compared to NAT in women older than 50 years, with high BMI and with invasive ductal carcinoma. Finally, through sequencing and mtDNA quantification, a decrease in mtDNA content was detected in BCT from samples with haplogroups B2 and C1; and in samples containing variants A249del, A290del, A291del and C16327T; while an increase was detected in samples with variants C16111T, G16319A and T16362C.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Características del cáncer

Después de la creciente evidencia de que el cáncer es una enfermedad compleja y que la tumorigénesis en humanos es un proceso multifactorial, Hanahan y Weinberg en el año 2000 publicaron una importante revisión titulada “Hallmarks of cancer”, en la cual se menciona que existen seis alteraciones en la fisiología celular esenciales para la generación de un genotipo y fenotipo canceroso: 1) mantenimiento de la señalización proliferativa, 2) evasión de los supresores de proliferación, 3) evasión de muerte programada de células, 4) inmortalidad replicativa, 5) angiogénesis sostenida e 6) invasión y metástasis [1]. Subsecuentes avances en la investigación de esta enfermedad han servido para clarificar y modificar la propuesta original, y se han incluido nuevas características del cáncer: evasión de la destrucción por el sistema inmune, inestabilidad genómica y mutación, inflamación promotora de tumores y reprogramación del metabolismo energético celular (Figura 1) [2].

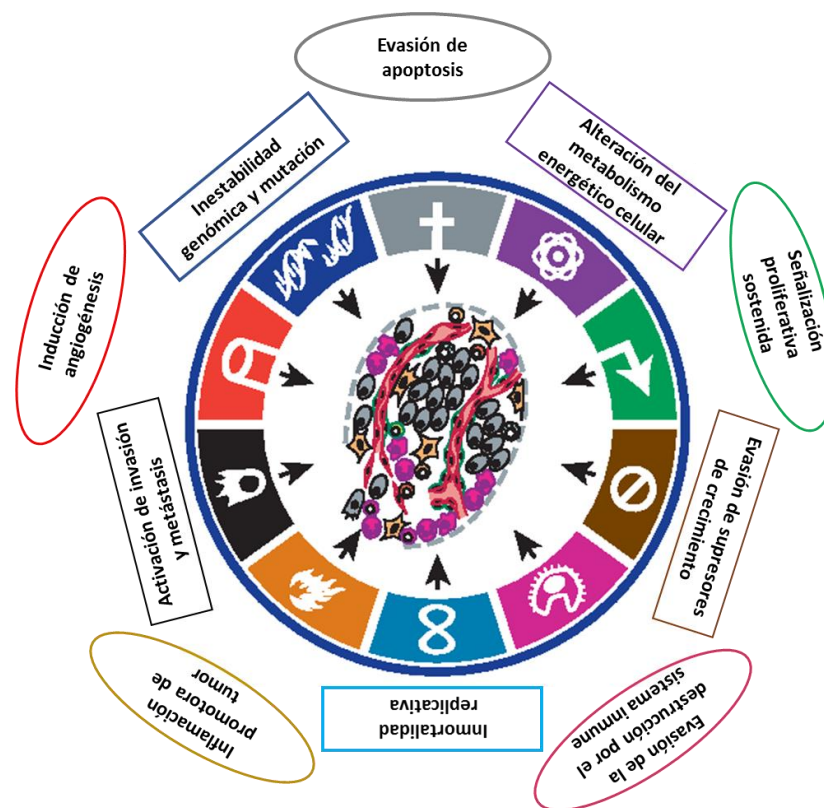


Figura 1. Características del cáncer. Características adquiridas por la mayoría de los tipos de cáncer durante su origen y desarrollo. Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011.

1.2 Reprogramación metabólica de células cancerosas

Como se ha mencionado anteriormente, la reprogramación del metabolismo energético es una característica distintiva del genotipo y fenotipo tumoral, a la cual se le ha puesto suma atención en los recientes años; sin embargo, esta hipótesis fue revisada y propuesta por Otto Warburg y colaboradores en la década de 1920. Ellos identificaron que en células cancerosas se observa un metabolismo de glucosa aberrante al que ahora se le conoce como efecto Warburg [3,4].

Para entender el efecto Warburg, es importante conocer el metabolismo en las células normales. Como es bien sabido, la glucosa es la principal fuente de energía y carbón para las células de mamíferos, que además de proveer energía en forma de ATP proporciona metabolitos para varias vías anabólicas [5]. En este proceso, la glucosa es tomada por las células a través de transportadores de glucosa, posteriormente es metabolizada a piruvato en el citosol a través de un proceso multipasos conocido como glucólisis, en el cual se produce una pequeña cantidad de ATP (2 ATPs). Asimismo, el piruvato derivado de la glucólisis es predominantemente importado a la matriz mitocondrial donde es oxidada en acetil coenzima A (CoA) por el complejo piruvato deshidrogenasa (PDH). El acetil CoA alimenta el ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA) seguido por la fosforilación oxidativa (OXPHOS) dando como resultado una eficiente generación de ATPs ([3].

Por el contrario, en el efecto Warburg o glicólisis aerobia, las células cancerosas muestran alteraciones en el consumo del metabolismo de glucosa. Comparado con células normales, se ha reportado que una gran cantidad de células cancerosas sufren una reprogramación del uso de OXPHOS a glucólisis. Estas células típicamente exhiben un incremento drástico en el consumo de glucosa y tasa glucolítica. El incremento en el consumo de glucosa genera muchos metabolitos, intermediarios glucolíticos y una significativa actividad de ATP vía glucólisis. Por otra parte, después de la glucólisis, la mayor parte del piruvato es convertido en lactato en el citoplasma por acción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), posteriormente es secretado fuera de la célula en lugar de ser oxidado en acetil CoA. Este fenómeno puede ocurrir incluso en presencia de suficiente oxígeno para llevar a cabo la respiración mitocondrial [6].

Actualmente se ha sugerido que los mecanismos responsables para el desarrollo del efecto Warburg son: microambiente tumoral y estabilización de HIF, alteraciones mitocondriales en células cancerosas, mutaciones del DNA nuclear, cambios epigenéticos, miRNAs, metabolismo de glutamina, modificaciones postraduccionales, activación oncogénica y pérdida de genes supresores de tumores (Figura 2) [7].

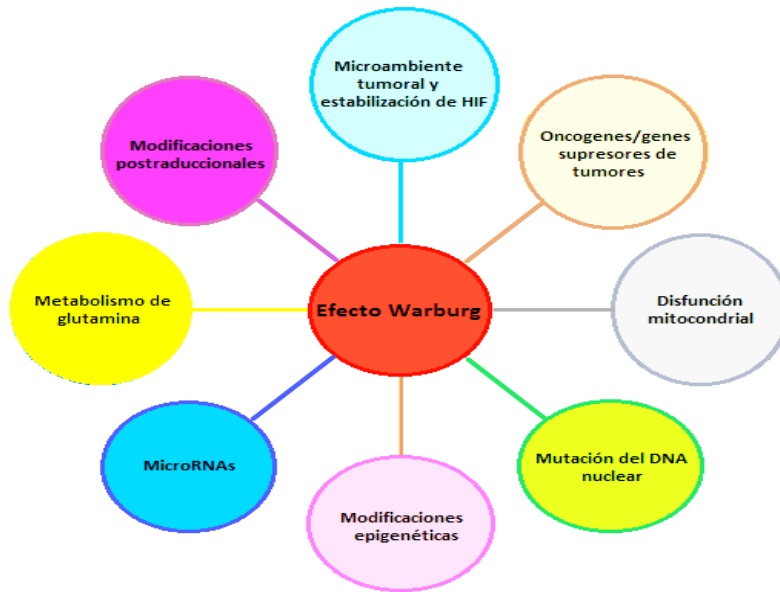


Figura 2. Mecanismos responsables del efecto Warburg. Modificado de Upadhyay, 2013.

1.3 La proteína supresora de tumor p53 y efecto Warburg

La proteína canónica de 53 kD p53 (también conocida como WTP53, p53, FLp53 [full length], p53 α o TAp53 α), es la principal y más abundante forma codificada por el gen *TP53* que consta de 11 exones, de los cuales el primero no es codificante (Figura 3A). La proteína p53 está formada por 393 amino ácidos y posee 7 dominios funcionales. El dominio de transactivación está compuesto de dos partes (TAD-1 y TAD-2), que son necesarios para inducir la regulación de subconjuntos distintos de genes que son blanco de WTP53. También contiene un dominio rico en prolina (PXXP) y un dominio de unión a DNA (DBD). Finalmente, el dominio C-terminal abarca un dominio de oligomerización (OD) que contiene un dominio de señal de localización nuclear y un dominio de regulación negativa (Figura 3B) [8].

La proteína p53 es regulada rápidamente en células normales no estresadas principalmente por acción de la ligasa tipo 3 MDM2, la cual promueve la poli ubiquitinación y degradación proteosomal de WTP53 [9]. Esta proteína también es regulada en respuesta a varios tipos de estrés celular a nivel transcripcional y traduccional por diferentes modificaciones postraduccionales como fosforilaciones, acetilaciones, nedilaciones, sumoilaciones y metilaciones. Estas modificaciones definen el futuro de WTP53, así como su localización subcelular, degradación e interacción con otras proteínas dando como resultado una respuesta después del estrés celular [10].

En relación a la función de p53, se sabe que esta proteína es una importante supresora de tumores que se activa en respuesta a alteraciones de la homeostasis

celular normal como la activación oncogénica, estrés ribosomal, daño al DNA, erosión de telómeros, privación de nutrientes, choque térmico, infección viral, cambios de pH e hipoxia [11]. Después de su activación, p53 se une a secuencias de DNA específicas llamadas elementos responsivos a p53 en sus genes blanco para regular la expresión de los mismos [12]. Finalmente, se desencadena un número de respuestas celulares importantes en las que se incluye la apoptosis, arresto del ciclo celular, supervivencia, reparación del DNA, mantenimiento de estabilidad genómica, senescencia y regulación metabólica [11,13].

Recientes estudios han revelado que la regulación metabólica es una nueva e importante función de WTP53. Este factor de transcripción regula diferentes aspectos del metabolismo celular como glucólisis, fosforilación oxidativa mitocondrial, vía de las pentosas fosfato, síntesis de ácidos grasos y oxidación [14].

Se ha observado que la glucólisis se encuentra aumentada y desacoplada del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y OXPHOS en tumores sólidos y líneas celulares de cáncer [3]; sin embargo, distintas investigaciones han demostrado que la proteína WTP53 puede reducir y contrarrestar el desacople metabólico por distintos mecanismos. Por una parte, se sabe que con la finalidad de disminuir el consumo de glucosa que es requerido en la glucólisis, la activación de WTP53 inhibe directamente la transcripción de los genes *SLC2A1* (GLUT1) y *SLC2A4* (GLUT4) e indirectamente a *SLC2A3* (GLUT3) por la vía IKK-NF-κB [15,16].

De forma adicional, WTP53 puede inducir la expresión de TIGAR (regulador de apoptosis y glucólisis inducido por WTP53) el cual actúa como una fructosa-2,6-bisfosfatasa que reduce la concentración intracelular de fructosa-2,6-bisfosfato, resultando en una reducción de la glucólisis y desvío del catabolismo de glucosa a la vía pentosa fosfato [17]. La proteína WTP53 también tiene la habilidad de inducir la ubiquitinación e inactivación de la enzima glucolítica fosfoglicerato mutasa (PGM, enzima que cataliza la octava reacción de la glucólisis) y así reprimir la vía glucolítica y promover la respiración celular [18]. Otra enzima glucolítica clave que es regulada por WTP53 para la disminución de la tasa glucolítica es ENO-1A, la cual se encarga de catalizar la deshidratación de 2-D-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato, [19].

Otra característica del efecto Warburg es el incremento en la producción de lactato y excreción del mismo al medio extracelular. Se ha determinado que la lactato deshidrogenasa A (LDHA), una subunidad de lactato deshidrogenasa (LDH), juega un papel importante en la regulación glucolítica al catalizar el piruvato a lactato en el paso final de la glucólisis [20]. En distintos tumores sólidos se ha observado una sobreexpresión de LDHA en varios tipos de cáncer asociados con un mal pronóstico [21,22]. Posteriormente, el lactato es excretado al medio extracelular por una sobreexpresión de transportadores de lactato (monocarboxylate transporters,

MCTs, por sus siglas en inglés) [23], resultando en una acidificación del microambiente tumoral, la cual favorece procesos carcinogénicos como metástasis, angiogénesis e inmunosupresión [24]. Se ha observado que la proteína WTP53 es capaz de revertir el efecto Warburg al regular la sobreexpresión de la enzima LDHA para disminuir la producción de lactato [25], además de reprimir transcripcionalmente al transportador de lactato MCT1 con la finalidad de disminuir la secreción de lactato al medio extracelular [26].

También se ha observado que WTP53 contrarresta el metabolismo glucolítico al promover el metabolismo oxidativo mitocondrial por la disminución de la expresión de PDK2 (piruvato deshidrogenasa cinasa 2), con lo cual se favorece la conversión de piruvato en acetil-CoA en lugar de lactato [27]; además, p53 induce la expresión del transportador de cobre SCO2 (Síntesis de citocromo c oxidasa 2), mismo que es necesario para el ensamble y correcto funcionamiento de citocromo c oxidasa (complejo IV) en la cadena de transporte de electrones [28] y se ha observado que tras alteraciones en el gen SCO2 en células de cáncer humano deficientes de WTP53, se induce un cambio metabólico de OXPHOS a glucólisis [28]. Adicionalmente, se sabe que niveles basales de WTP53 son suficientes para la expresión de AIF (factor inductor de apoptosis), el cual reside en la membrana mitocondrial ayudando a mantener una función respiratoria mitocondrial óptima y protege a las células de las consecuencias del daño oxidativo; y por otra parte, bajo condiciones de estrés excesivo se induce una disfunción mitocondrial culminando en apoptosis independiente de caspasas por la translocación de AIF de la mitocondria al núcleo, provocando una fragmentación del DNA a gran escala [29].

Asimismo, se ha observado que después de la activación de WTP53, este se une al promotor del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) para inducir un incremento en el número de copias del DNA mitocondrial (mtDNA), de esta forma se puede favorecer el uso de OXPHOS, mientras que una reducida expresión de WTP53 provoca una reducción de TFAM y una disminución en el número de copias, resultando en una deficiente OXPHOS [30–32].

Por otra parte, recientemente se han caracterizado nuevas isoformas de p53, mismas que son expresadas en algunos tipos de tumores. En relación a éstas, algunos investigadores han estudiado su posible papel en el desarrollo y progresión del cáncer; sin embargo, a la fecha no se ha descrito su función sobre el metabolismo energético de células cancerosas; por tal motivo, el presente trabajo buscó abordar esta temática. A continuación se describen las características y funciones que se conocen acerca de las isoformas de la proteína p53.

1.4 Isoformas de p53 y sus funciones

En los años recientes se ha descrito que al menos 12 isoformas son codificadas por el gen *TP53* (p53 α o WTP53, p53 β , p53 γ , Δ 40p53 α , Δ 40p53 β , Δ 40p53 γ , Δ 133p53 α , Δ 133p53 β , Δ 133p53 γ , Δ 160p53 α , Δ 160p53 β , Δ 160p53 γ). Estas isoformas son obtenidas a través de inicio de la traducción alternativo, uso de promotores alternativos, y procesamiento alternativo (Figura 3) [8].

Se ha identificado que WTP53 contiene un promotor interno (*P2*) de forma adicional a su promotor proximal (*P1*). El promotor proximal controla la expresión de p53 (α , β y γ); adicionalmente, la completa exclusión del intrón 9 de WTP53 genera la forma α que contiene el dominio canónico C-terminal con un OD funcional, mientras que una parcial retención del intrón 9, también llamado exón 9b y exón 9g da lugar a las formas β y γ respectivamente generando 2 diferentes proteínas humanas truncadas (Figura 3A). El OD completo es remplazado por 10 y 15 aminoácidos en las isoformas β y γ respectivamente, esto como resultado de la presencia de un codón de paro en los exones 9b y 9g (Figura 3) [8]. El dominio OD de WTP53 es muy importante para la regulación de la proteína debido a que contiene un sitio de ubiquitinación para la mayoría de las ligasas de ubiquitina como MDM2 [33,34].

1.4.1 Isoformas p53 β y p53 γ

En el aspecto funcional, existes estudios que muestran que la isoforma p53 β se puede unir específicamente a promotores responsivos a WTP53 en una manera dependiente de promotor. Por ejemplo, p53 β se une preferencialmente al promotor *Bax* (un gen proapoptótico), pero pobremente al promotor *Mdm2* (una ligasa de ubiquitina de la proteína p53), mientras que en WTP53 la afinidad es contraria. También se ha mostrado que esta isoforma induce senescencia celular replicativa cuando es coexpresada con WTP53 en fibroblastos humanos normales [35,36]. En células de carcinoma renal, el RNA mensajero (mRNA) de la isoforma p53 β se encuentra significativamente sobreexpresado y asociado con un estadio tumoral avanzado [37].

La isoforma p53 γ se expresa en tejidos normales humanos tanto en el núcleo como en citoplasma, se sabe que esta isoforma regula la expresión de genes independientes de WTP53 así como sensibilizar células nulas de WTP53 a quimioterapia [38,39]. En carcinoma seroso uterino, p53 γ se ha asociado con una reducida supervivencia sin progresión [40].

1.4.2 Isoformas Δ 40p53 α , β y γ

La isoforma Δ 40p53 α (también conocida como p47 o Δ Np53) es generada por procesamiento alternativo del intrón 2 y/o un inicio de la traducción alternativo. Se sabe que la retención de una parte del intrón 2 (*i2*) da origen a un codón de paro entre el exón 2 y 3 en la posición p53 $i2$ del mRNA originando un inicio de la

traducción en AUG40. Por otra parte, se han identificado dos sitios de entrada de ribosoma interno (IRES) en el mRNA de p53, los cuales permiten su traducción en una forma independiente de cap bajo condiciones de estrés citotóxico y estrés del retículo endoplásmico. Como resultado, esas secuencias IRES contribuyen al inicio de la traducción alternativa en el codón AUG40 en lugar de AUG1 conduciendo a la expresión de $\Delta 40p53$ [36]. La isoforma $\Delta 40p53$ carece de los primeros 39 amino ácidos y por lo tanto del principal dominio de transactivación de p53 (TAD1); sin embargo, conserva el segundo dominio de transactivación (TAD2) (Figura 3B) [8].

Se ha observado que al cotransfectar $\Delta 40p53\alpha$ y WTP53 se induce una reducción en la poliubiquitinación y degradación de p53 mediada por Mdm2, y este efecto se asoció también con un incremento en monoubiquitinación y exporte de WTP53 al núcleo [41]. Estudios en modelos animales indican que ratones heterocigotos ($p53/\Delta 40p53$) son menos propensos a desarrollar cáncer en comparación con heterocigotos $p53^{+/-}$ [42]. En carcinoma seroso de ovario y carcinoma mucinoso de ovario, el incremento en la expresión del mRNA de $\Delta 40p53\alpha$ se asocia con un menor grado tumoral y mejor supervivencia libre de recaída [43,44]. En células de melanoma, se ha observado que después de la transfección de $\Delta 40p53\alpha$ se induce apoptosis para la supresión del crecimiento celular e inducir senescencia [45] y arresto en G1 en células de carcinoma hepatocelular [46].

En cuanto al efecto metabólico, un estudio realizado en ratones transgénicos $\Delta 40p53$ (p44tg) mostró desarrollo de hipoinsulinemia e intolerancia a la glucosa a los 3 meses de edad, efecto que empeora en ratones mayores. Adicionalmente se observa una baja expresión de ciclina D2 y Pdx1 (dos reguladores clave de la proliferación), mientras que se da un incremento del inhibidor del ciclo celular p21[47].

Por otra parte, a pesar de que se han detectado las isoformas endógenas $\Delta 40p53\beta$ y $\Delta 40p53\gamma$ en líneas celulares, sus funciones biológicas aún no han sido investigadas [36].

1.4.3 Isoformas $\Delta 133p53\alpha$, β y γ

Se ha demostrado que el promotor interno P2 de WTP53 humano (intrón 4) es transactivado directamente por WTP53 en respuesta a estrés genotóxico, conduciendo a la inducción de la isoforma $\Delta 133p53$. Esta isoforma inicia su traducción en el codón 133 perdiendo los dos dominios de transactivación (TAD1 y TAD2); así como el dominio PXXP como se muestra en la figura 3B [8].

La expresión de $\Delta 133p53\alpha$ regula la expresión de genes en manera dependiente e independiente de WTP53; por ejemplo, $\Delta 133p53\alpha$ causa una inhibición de la apoptosis dependiente de WTP53 y arresto en G1 sin inhibir el arresto de G2

dependiente de WTP53 en células humanas U2OS y H1299 [38,48]. Por otra parte, la expresión de $\Delta 133p53\alpha$ inhibe la senescencia replicativa y promueve la proliferación celular de fibroblastos humanos normales por medio de la inhibición de la expresión de p21. De forma adicional, $\Delta 133p53\alpha$ reprime la expresión de miR-34a para regular la senescencia mediada por WTP53 [35]. Experimentos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que esta isoforma también promueve la migración de células endoteliales, angiogénesis, y metástasis al regular la expresión de genes angiogénicos independientemente de WTP53 [49]. Asimismo, recientemente se ha reportado que la expresión de $\Delta 133p53$ es inducida por irradiación gamma y promueve vías de reparación de rompimiento de DNA de doble cadena, por lo que se sugiere que la expresión de esta isoforma confiere a las células tumorales tolerancia a tratamiento por radioterapia en pacientes con cáncer [50]. También se ha mostrado que la interacción de la bacteria *Helicobacter pylori* con células epiteliales gástricas induce la expresión de $\Delta 133p53\alpha$ en células humanas, una vez expresada esta isoforma, inhibe las actividades de p53 y p73 e induce a NF-kB con lo cual se incrementa la supervivencia de las células infectadas [51].

En estudios clínicos, se ha encontrado que la isoforma $\Delta 133p53\alpha$ es expresada en pacientes con cáncer de ovario avanzado y p53 mutado [44] y también se ha asociado con baja supervivencia de individuos con colangiocarcinoma [52]. Además, en un modelo de ratón transgénico $\Delta 133p53$, se observó un decremento en la supervivencia con un fenotipo de tumoral más agresivo comparado con ratones nulos de WTP53, además del desarrollo de tumores, estos ratones mostraron un fenotipo proinflamatorio con un incremento en las concentraciones de interleucina 6 en suero y agregación de linfocitos en pulmón e hígado [53]. Con relación a las isoformas $\Delta 133p53\beta$ y $\Delta 133p53\gamma$, se ha determinado que la coexpresión de $\Delta 133p53\beta$ o $\Delta 133p53\gamma$ con WTP53 no altera la actividad transcripcional de WTP53 sobre los promotores p21, Bax ni en la apoptosis mediada por WTP53. También se ha observado que $\Delta 133p53\beta$ o $\Delta 133p53\gamma$ son expresadas en tejidos humanos normales, mientras que estudios clínicos indican una sobreexpresión de las mismas en carcinoma renal y de mama invasivo [38,54].

1.4.5 Isoformas $\Delta 160p53\alpha$, β y γ

Recientemente se han caracterizado las isoformas $\Delta 160p53\alpha$, $\Delta 160p53\beta$ y $\Delta 160p53\gamma$, las cuales carecen de los primeros 159 aminoácidos de $WTp53$. También se sabe que estas isoformas son codificadas por los mRNAs $\Delta 160p53\alpha$, $\Delta 160p53\beta$ y $\Delta 160p53\gamma$ respectivamente a través de un inicio de la traducción alternativo en ATG 160. Estudios de estas isoformas reportan una baja expresión de $\Delta 160p53\beta$ y una expresión estable de $\Delta 160p53\alpha$ durante la diferenciación eritróide de células K562 [55].

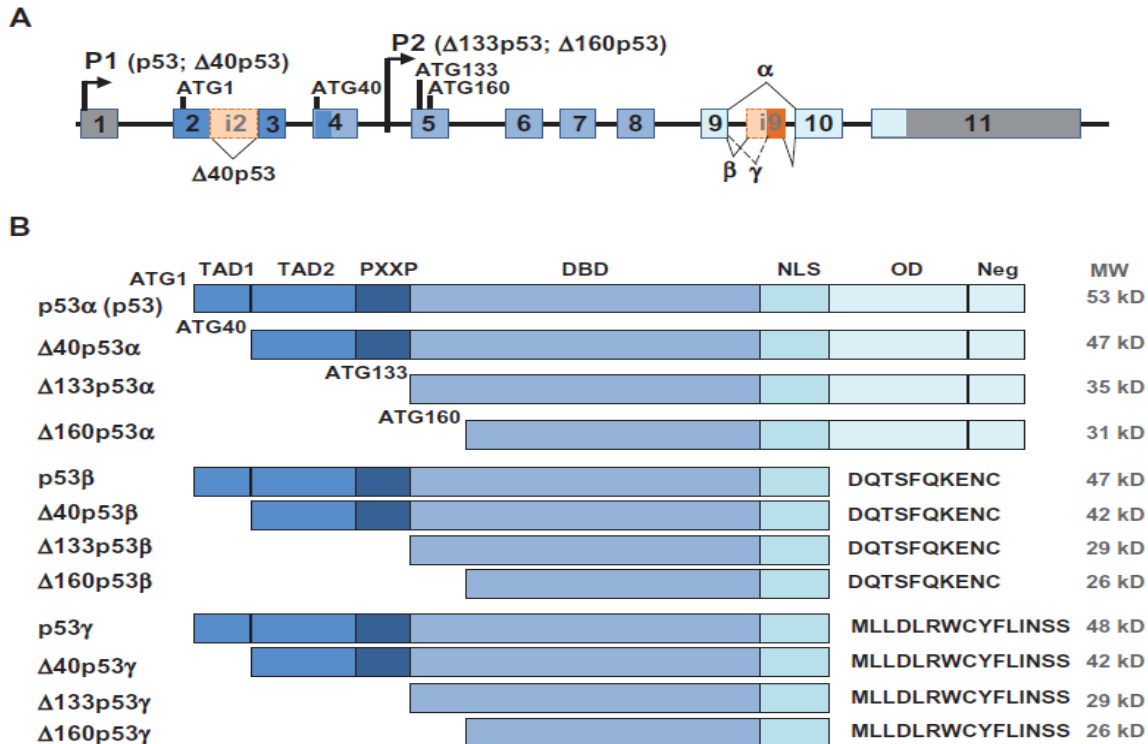


Figura 3. Representación esquemática de las isoformas codificadas por el gen $TP53$.

(A) Estructura del gen $WTp53$. El gen $WTp53$ comprende 11 exones y codifica distintas isoformas de p53 usando promotores alternativos (\rightarrow), sitios de procesamiento alternativo (\wedge), sitios de inicio de la traducción alternativos (I). (B) Isoformas de p53 humanas. La proteína $WTp53$ canónica (p53 α) tiene dos dominios de transactivación (TAD1, aminoácidos del 1-42 y TAD2, aminoácidos del 43-63), un dominio rico en prolina (PXXP, aminoácidos del 64-92), un dominio de unión a DNA (DBD, aminoácidos del 102-306), un dominio de localización nuclear (NLS, aminoácidos del 316-325), un dominio de oligomerización (OD, aminoácidos del 307-355), y un dominio de regulación negativa (Neg, aminoácidos del 364-393). MW, peso molecular; kD, kilo Dalton. Surget et al., 2013.

1.5 Efecto del número de copias del mtDNA con el desarrollo de cáncer

De manera adicional a las alteraciones en el genoma nuclear, desde la década de 1920, Otto Warburg observó que en células de cáncer existía una fermentación de glucosa en presencia de oxígeno, lo que sugería que defectos en la respiración mitocondrial pueden ser una causa del desarrollo y progresión del cáncer [56].

El genoma mitocondrial consta de múltiples copias de moléculas de DNA circular de doble cadena (16.6 kb en humanos), el cual codifica para 13 polipéptidos esenciales del sistema de OXPHOS, y la maquinaria de RNA necesaria para la traducción (2 rRNAs y 22 tRNAs) como se muestra en la figura 4 [57].

La mitocondria puede contribuir a transformación maligna por distintas alteraciones genéticas. Estos mecanismos incluyen mutaciones del mtDNA, eliminaciones, alteraciones en el número de copias, así como polimorfismos determinantes de haplogrupos [58–61]. Aunque todo el genoma mitocondrial puede estar sujeto a mutaciones somáticas, la región D-loop es conocida como un hot spot mutacional en cáncer humano. Estas mutaciones en la región D-loop pueden influir significativamente en el número de copias del mtDNA [58]. Se ha observado que en estadios avanzados de carcinoma hepatocelular, gástrico y colorectal existe una asociación entre mutaciones en la región D-loop y una disminución significativa en el número de copias del mtDNA [62]. Por otra parte, en distintos tipos de cáncer se ha reportado una disminución significativa en el número de copias en tejidos tumorales comparado con sus pareados tejidos normales adyacentes [60].

Se sabe también que la proteína WTp53 regula la transcripción del factor TFAM al unirse a su promotor y que la expresión de TFAM puede incrementar el número de copias del mtDNA, mientras que la baja expresión de WTp53 y TFAM reducen el número de copias del mtDNA al menos *in vitro* [30]. Se ha demostrado que la disminución en el número de copias afecta directamente la expresión de genes y la síntesis de proteínas dando como resultado una alteración de OXPHOS en células cancerosas [63]. Reportes indican que la pérdida de funcionalidad de OXPHOS se encuentra asociada con un efecto antiapoptótico en una línea celular derivada de osteosarcoma humano, mientras que una eficiente actividad de OXPHOS induce la activación de las proteínas Bax y Bak provocando muerte celular en las líneas celulares MCF-7 y HepG2 [64,65].

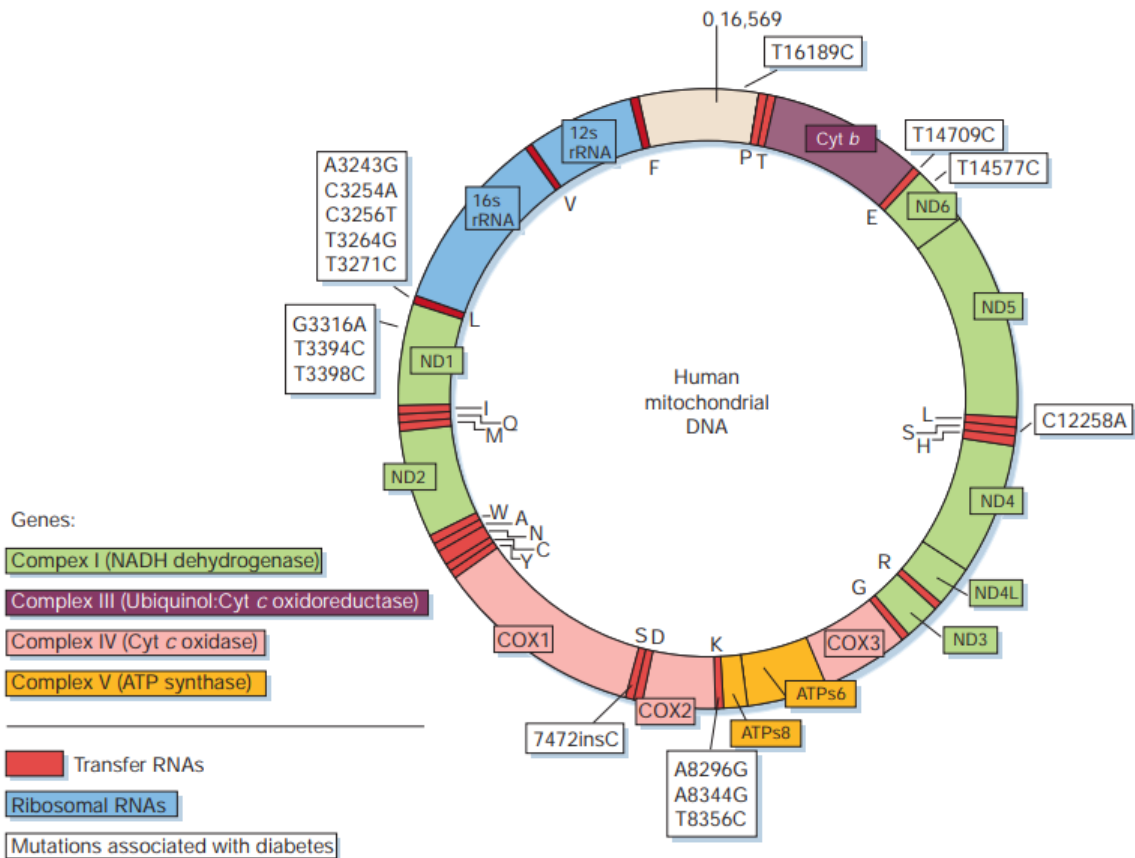


Figura 4. Genoma mitocondrial y mutaciones asociadas con DMT2. El genoma mitocondrial codifica 37 genes: 13 polipéptidos, 22 tRNAs, 2 rRNAs. Los polipéptidos son constituyentes de los complejos de la cadena respiratoria: 7 subunidades del complejo I (NADH deshidrogenasa), una subunidad del complejo III, (Ubiquinol: Citocromo *c* oxidorreductasa), 3 subunidades del complejo IV (citocromo *c* oxidasa) y, 2 subunidades del complejo V (ATP sintasa). Los genes para los tRNAs son representados como símbolo de letras correspondientes al aminoácido que transporta durante la traducción. Las mutaciones asociadas a la DMT2 son representadas en los cuadros blancos. Tomada de Maechler and Wollheim, (2001).

1.6 Efecto de haplogrupos mitocondriales con el desarrollo de cáncer

El análisis del mtDNA ha sido una potente herramienta para el entendimiento de la evolución humana, debido a sus características como el número de copias, aparente nula recombinación, alta tasa de mutación ($\sim 0.017 \times 10^{-6}$ sustituciones/sitio/año) y modelo materno de herencia. La mayoría de los estudios de evolución humana se basan en el análisis de la secuencia de la región D-loop del mtDNA, la cual constituye menos del 7 % del genoma mitocondrial (~ 1100 pb), y posee dos regiones hipervariables (RHV) ($\sim 0.075 - 0.165 \times 10^{-6}$ sustituciones/sitio/año), las cuales son RHVI que abarca de la región 16024 a 16365 y RHVII que abarca de la región 073 a 340 [66,67].

Por las características antes mencionadas, se sabe que desde que las mujeres migraron fuera de África hacia los diferentes continentes hace 130,000 – 200,000 años atrás, acumularon mutaciones en el mtDNA que hoy en día se consideran de alta frecuencia y son polimorfismos específicos de continentes o de etnias. Esos polimorfismos son asociados a haplotipos (conjunto de variaciones en el DNA que se heredan como un bloque) y haplogrupos (grupo de haplotipos similares que comparten un ancestro en común y tiene los mismos SNPs en todos los haplotipos) del mtDNA [68]. De esta forma se conoce la distribución y migración de los principales haplogrupos alrededor el mundo.

De acuerdo con diversos estudios, se ha reportado que el haplogrupo mitocondrial D4a se encuentra asociado con un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de tiroides en una población China; mientras que los haplogrupos K, M y D5 son factor de riesgo al desarrollo de cáncer de mama en pacientes asiáticos y europeos-americanos [69–71]. Los mecanismos por los cuales los haplogrupos mitocondriales se asocian con el riesgo a desarrollar cáncer aún no han sido descritos completamente. En un estudio se demostró que el haplogrupo D5 puede promover tumorigénesis a través de la sobreactivación de AKT mediada por el incremento de ROS, así como una reducida función de OXPHOS debido a una baja actividad de los complejos I y II [70].

II. JUSTIFICACIÓN

Debido a que en líneas celulares cancerosas y tumores sólidos se ha encontrado el metabolismo glucolítico y mitocondrial alterado, y dado que existe un escaso conocimiento acerca de las funciones metabólicas de las isoformas de la proteína p53 y el contenido del mtDNA en el desarrollo y progresión del cáncer, es necesario investigar cómo estas regulan el metabolismo glucolítico y mitocondrial de líneas celulares cancerosas y como se asocian con tumores sólidos.

III. HIPÓTESIS

Si se ha reportado que isoformas de p53 y el contenido del mtDNA se encuentra asociado en procesos carcinogénicos; entonces, se encontrará un desbalance energético celular provocado por la presencia de isoformas de p53 y el contenido en el número de copias del mtDNA en la línea celular H1299 y tumores sólidos de cáncer de mama.

IV. OBJETIVOS

4.1 General

Evaluar el efecto de las isoformas $\Delta 40p53\alpha$, $\Delta 133p53\alpha$ y el contenido del mtDNA sobre el metabolismo energético de células H1299 y su asociación con tumores sólidos de cáncer de mama.

4.2 Particulares

- Determinar si las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ regulan el consumo de glucosa y secreción de lactato en la línea celular H1299.
- Estudiar si las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ regulan cambios en la expresión de proteínas del metabolismo glucolítico (GLUT1, GLUT4, MCT1, MCT4, ENO-1A) y mitocondrial (PDK2, PDH-E1 α y AIF) en la línea celular H1299.
- Evaluar el efecto de las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ sobre el cambio en el número de copias del mtDNA en la línea celular H1299.
- Identificar las isoformas $\Delta 40p53\alpha$, $\Delta 133p53\alpha$, p53 β/γ en tejido de cáncer de mama y su correspondiente tejido normal adyacente.
- Cuantificar el número de copias del mtDNA en tejido de cáncer de mama y su correspondiente tejido normal adyacente.
- Determinar el haplogrupo mitocondrial de las pacientes en estudio.
- Determinar la asociación de las variables en estudio provenientes de pacientes mexicanas con cáncer de mama.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

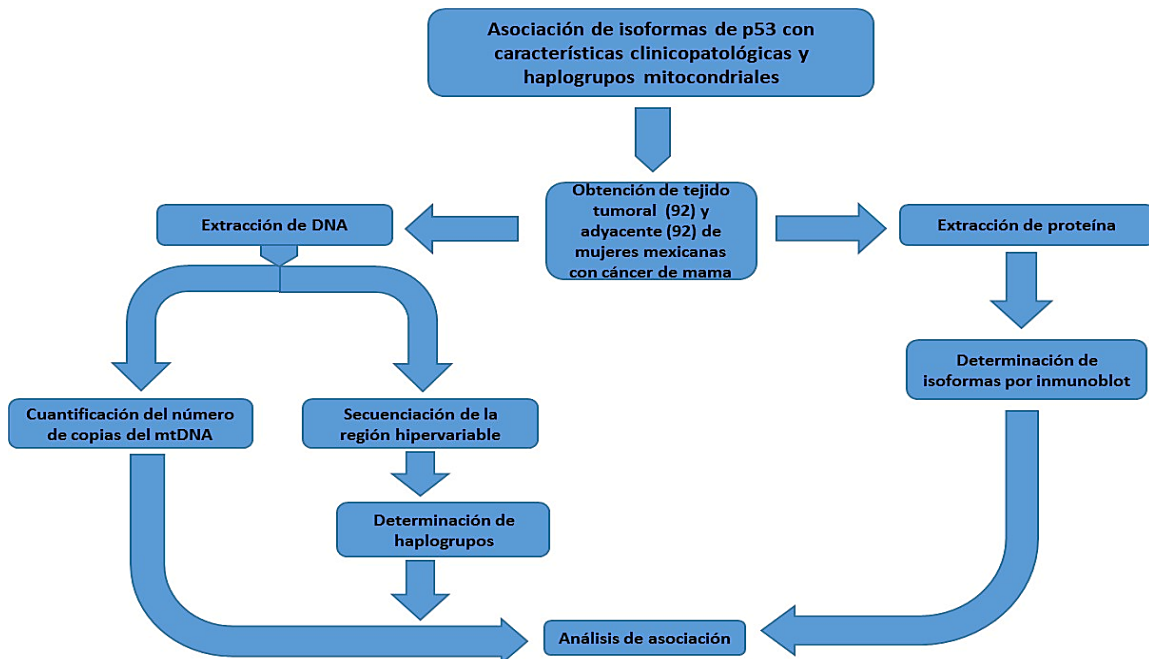
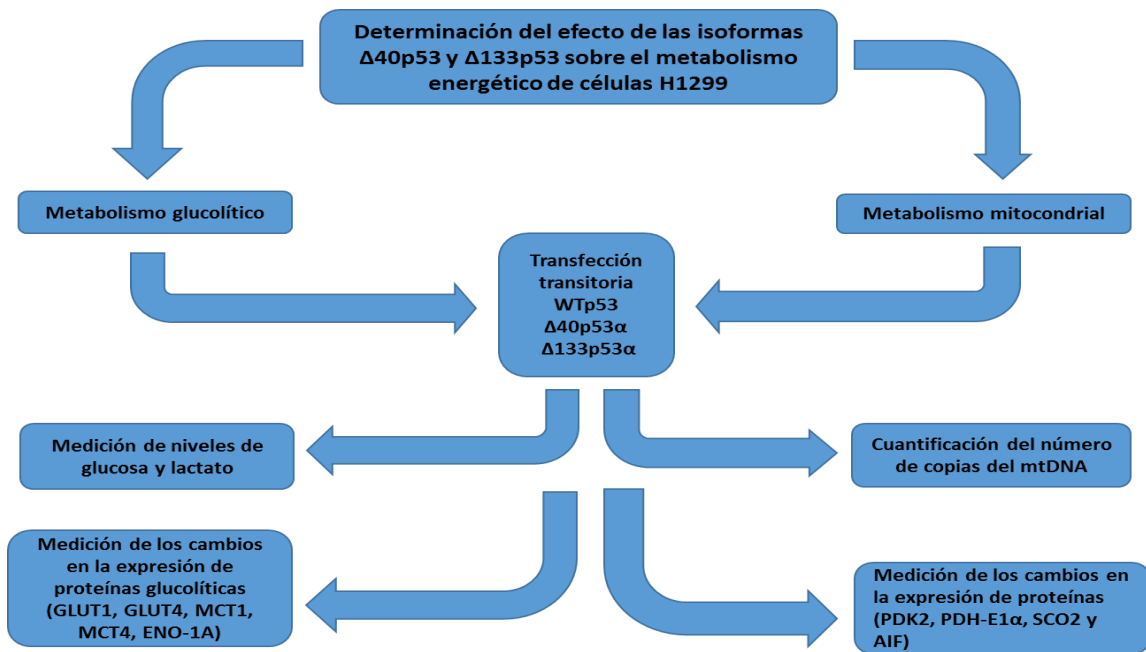


Figura 5. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular humanas H1299, la cual es derivada de cáncer de pulmón con una delección parcial homocigota del gen *p53* que ocasiona una pérdida de la expresión de la proteína p53. Esta línea celular se mantuvo en medio RPMI 1640 (RPMI/Gibco) suplementada con suero bovino fetal al 10% (FBS) (Gibco/Lifes Technologies), 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. En todos los experimentos las células se mantuvieron a 37°C, 5% de CO₂, y la atmósfera del aire al 95% dentro de placas tipo Petri.

También se trabajaron las líneas celulares de cáncer de mama MCF7 y T-47D. MCF7 fue mantenida en medio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM, Gibco), suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) (Gibco/Lifes Technologies), 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina. La línea celular T-47D fue mantenida en medio RPMI-1640 (RPMI/Gibco) suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) (Gibco/Lifes Technologies), 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina y adicionalmente con 0.2 unidades/ml de insulina bovina. Ambas líneas se mantuvieron a 37°C, 5% de CO₂, y la atmósfera del aire al 95% dentro de placas tipo Petri.

Dentro de una campana de flujo laminar, a las células en crecimiento en placas de cultivo se les retiró el medio de cultivo y se lavó dos veces con 2.5 mL de tampón fosfato salino (PBS 1X, por sus siglas en inglés) y retirando el tampón en cada lavada; posteriormente se adicionaron 500 µL de tripsina (cuidando no dejar actuar por más de 10 min.), después de que se desprendieron las células, la tripsina se inactivó adicionando 500 µL de medio con suero y la solución se pasó a un micro tubo de 1.5 mL y se centrifugó a 3000 rpm por 2 minutos y medio, después se retiró el sobrenadante cuidadosamente y se resuspendió la pastilla celular en 1 mL de medio con suero. Posteriormente, se tomaron y mezclaron 20 µL de la suspensión celular con 20 µL de solución de azul de tripano, subsecuentemente se tomaron 10 µL de esta solución y se cargaron en una cámara Neubauer para contar la densidad celular. Finalmente se realizó un cálculo para conocer la cantidad necesaria para sembrar una densidad celular de 400,000 células en placas P60 para los posteriores experimentos.

6.2 Muestras de tejido de pacientes con cáncer de mama

Se colectaron 92 muestras de tejido de cáncer de mama (TCM) y su correspondiente tejido normal adyacente (TNA) en la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Ginecología número 3, Centro Médico Nacional La Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), registrados en los proyectos con número 2015-785-016 y 2017-785-071. Las muestras fueron clasificadas de

acuerdo a edad, índice de masa corporal (IMC), subtipo histológico, estatus de receptores, estatus de menopausia, consumo del alcohol y consumo de cigarro. Ninguno de los pacientes a los que pertenecen las muestras recibió tratamiento previo antes de la extracción de los tejidos. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Comisión Nacional de Ética del IMSS. El estudio se realizó siguiendo las normas establecidas en el acuerdo de Helsinki. Todos la

s pacientes fueron debidamente informados y dieron su consentimiento para que los tejidos e información clínica fueran usados en el presente estudio.

6.3 Características clínicas de las pacientes con cáncer de mama

Las pacientes incluidas en este estudio fueron mujeres con un promedio de edad de 56.5 (± 10.64) años, y un promedio de IMC de 29.47 (± 4.82). Los subtipos histológicos que se registraron fueron carcinoma ductal invasivo I (CDI-I) en un 54 %, carcinoma ductal invasivo II (CDI-II) en un 10 %, carcinoma ductal invasivo grado III (CDI-III) en un 17 % y carcinoma lobular invasivo (CLI-I) en un 17 %. En relación a los receptores hormonales, 84 %, 78 % y 5 % fueron positivos para el receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2 por sus siglas en inglés), respectivamente; mientras que las pacientes clasificadas como cáncer de mama triple negativo (CMTN) corresponden al 16 %. En el estatus de menopausia, 18 % fueron clasificadas en premenopausia y 82 % en posmenopausia. Finalmente también se reportó que el 12 % de las pacientes eran fumadoras, mientras que el 6 % consumían alcohol.

6.4 Transfección

Para la expresión de las proteínas WTP53, $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ se utilizaron los plásmidos cmvp53ok, svp53lmm y cmvd133, respectivamente (Figura 6). Se utilizó un vector vacío (cmvp53_v) como control negativo, mientras que el vector cmvp53ok funcionó como nuestro vector positivo de expresión de la forma silvestre WTP53, esto debido a que ya se ha demostrado el efecto de WTP53 en la regulación de proteínas y metabolitos involucrados en el metabolismo energético celular. Los vectores svp53lmm y cmvd133 expresan nuestras isoformas problema en el presente trabajo ($\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$, respectivamente). Los plásmidos fueron donados por el Dr. Jean-Christophe Bourdon del departamento de medicina celular de la escuela de medicina de la Universidad de Dundee, Escocia.

Las transfecciones con los diferentes plásmidos se realizaron a una confluencia del 80 %. En primer lugar se preparó la solución A (Tabla 1) e incubó 15 minutos a temperatura ambiente, después de 12 minutos se preparó la solución B (Tabla 1) y se mezclaron ambas soluciones dejándolas incubar 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se retiró el medio de cultivo de las placas y se lavó dos veces con PBS 1X, subsecuentemente se adicionaron 5 mL (placas P100) o 2.5 mL

(placas P60) de medio sin SFB. Enseguida se adicionó la mezcla A-B e incubó por 4 horas a 37°C y 5% de CO₂. Pasadas las 4 horas se realizó la recuperación agregando 7 mL (placas p100) o 3 mL de medio (placas P60) con 10% de SFB + antibiótico. Los cultivos se dejaron incubar por 24 h para evaluar los efectos de interés.

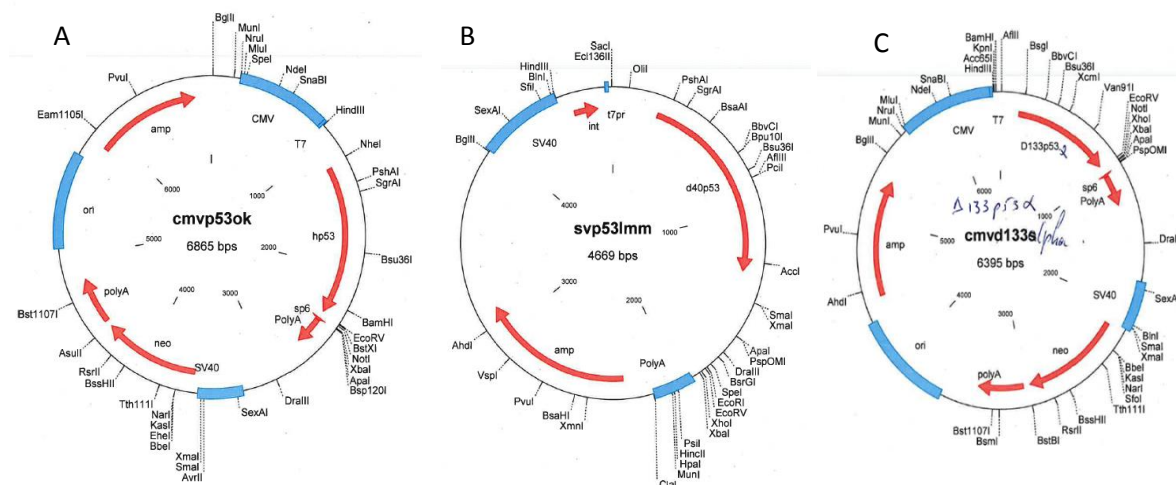


Figura 6. Plásmidos de expresión de las isoformas de la proteína p53. A) cmvp53ok expresa la proteína p53WT bajo el control del promotor temprano del citomegalovirus. B) svp53lmm expresa la proteína $\Delta 40p53\alpha$ bajo el promotor del virus del simio 40. C) cmvd133a expresa la proteína $\Delta 133p53\alpha$ bajo el promotor temprano del citomegalovirus.

Tabla 1. Preparación de las soluciones A y B para transfección.

Solución A			
Reactivo	Placa P100	Placa P60	Placa P35
Medio sin SFB y sin antibiótico	750 μ L	450 μ L	262.5 μ L
Reactivo Plus GIBCO	10 μ L	6 μ L	3.5 μ L
Plásmido	4 μ g	2 μ g	1 μ g
Solución B			
Medio sin suero y sin antibiótico	750 μ L	450 μ L	262.5 μ L
Lipofectamina LTX GIBCO	12 μ L	7.5 μ L	4.2 μ L

6.5 Extracción de proteínas e inmunoblot

Después de las transfecciones, las células se lavaron dos veces con PBS 1X y posteriormente se le adicionaron 500 μ L (placas P100) o 250 μ L (placas P60) de buffer de lisis RIPA (0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% DCA, 1 mM EDTA, 0.2 mg/mL RNasa, 0.2 mg/mL DNasa, 1mg/mL de inhibidor de proteasas) dejándolas incubar por 10 minutos en hielo. Después las células se recuperaron raspando las placas con un scraper y se recuperaron en un tubo de 1.5 mL. Finalmente, se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C, el sobrenadante se recuperó en tubos de 1.5 mL para ser usado inmediatamente o almacenados a -80°C.

Las proteínas totales de los tejidos fueron extraídos a partir de 100 mg de tejido tumoral o normal adyacente con el Kit Sample Grinding de acuerdo a las instrucciones de manufactura (GE 80-6483-37, GE Healthcare Life Science, New Jersey, USA) en un buffer que contiene 7M de Urea, 2M de tiourea, 4% de CHAPS (p/v), 30 mM de tris-HCL pH 8.5 y 50 mM de DTT. El buffer fue complementado con el coctel de inhibidores de proteasas Complete™ 1X (Roche, Mannheim, Germany). El lisado fue incubado en agitación a temperatura ambiente por 1 hora y centrifugado a 13,000 rpm. La concentración de proteínas se determinó usando el kit 2-D Quant de acuerdo a las instrucciones de manufactura (GE 80-648356, GE Healthcare Life Science, New Jersey, USA). Las muestras fueron alicuotadas y almacenadas a -80°C.

Una vez cuantificadas las proteínas, se tomaron 50 μ g de cada una y se mezclaron con buffer de carga. Posteriormente se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida. Las proteínas separadas se transfirieron en membranas de nitrocelulosa. Después se realizó el bloqueo con leche 0% grasa con agitación suave. Subsecuentemente, se incubó con los respectivos anticuerpos primarios de interés: anti-p53 (HR231 y DO-1), anti-Glut1 (A-4), anti-Glut4 (IF8), anti-MCT1 (H-1), anti-MCT4 (D-1), anti-ENO-1A, anti-PDH-E1 α (D-6) anti-PDK2 (3F2D7), anti-AIF (B-9) y anti- α -actina (1A4) como control interno de carga: Las incubaciones se hicieron a 4°C por toda la noche. Transcurrido el tiempo, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS 1X-T20, enseguida se incubó con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano por 1 h a temperatura ambiente, posteriormente se lavó 2 veces con TBS 1X-T20 y 1 lavado con TBS 1X. Finalmente las bandas se visualizaron con sustrato luminol.

6.6 Ensayo de consumo de glucosa

La cuantificación del consumo de glucosa se realizó con ensayos colorimétricos con ayuda de un kit comercial (Abcam, ab65333) después de la transfección de los plásmidos en los cultivos celulares. En este ensayo se utilizó una mezcla de enzimas de glucosa, las cuales oxidan la glucosa para generar un producto para generar un color ($\lambda = 570$ nm), donde el color generado es proporcional a la cantidad

de glucosa presente en la muestra. Los ensayos se realizaron de acuerdo a las instrucciones de manufactura.

6.7 Ensayo de secreción de lactato

Con ayuda de un kit comercial (Abcam, ab65331), se realizaron ensayos colorimétricos para determinar los niveles de lactato en los cultivos celulares después de ser transfectados. En este ensayo, el lactato es oxidado enzimáticamente y el producto generado reacciona con una sonda lactato y emite fluorescencia a $Ex/Em = 535/587$. Las células fueron incubadas por 48 h, después se colectaron 500 μ L del medio y se determinó el número de células. Las muestras de medio fueron procesadas de acuerdo a las instrucciones de manufactura y la fluorescencia se midió usando un lector de microplacas. Finalmente la concentración de lactato se normalizó por el número de células.

6.8 Extracción de DNA

El DNA genómico se obtuvo a partir de 40 mg de TCM o TNA. Cada tejido fue colocado en un microtubo de 1.5 mL con 15 μ g de buffer de lisis del kit Puregene Blood Core C y 15 μ l de proteinasa K a 56°C incubando toda la noche, y posteriormente se continuó el protocolo de acuerdo a las instrucciones de manufactura.

6.9 Amplificación de la región D-loop por PCR y secuenciación

La región D-loop del mtDNA fue amplificada usando el par de iniciadores: sentido L15996 (5'-CTCCACCATTAGCACCCAAAGC-3') y antisentido H408 (5'-CTGTTAAAAGTGCATACCGCCA-3') descritos previamente [72]. La amplificación por PCR se realizó de acuerdo al protocolo de High Fidelity Polymerase (PCR-204L, Jena Bioscience GmbH, Jena, Germany) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 50 s, alineamiento a 59 °C por 50 s, elongación de cadena a 68 °C por 1 min y extensión final a 68 °C por 3 min. Todos los productos de amplificado fueron purificados con SAP-Exo (PP-218L, Jena Bioscience GmbH, Jena, Germany) y posteriormente secuenciados con los iniciadores sentido y antisentido en reacciones separadas usando el kit de secuenciación BigDye Terminator v3.1 Cycle (cat. no. 4337456, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) en el equipo ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer (PE Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

6.10 Determinación de haplogrupos mitocondriales

Las secuencias fueron comparadas con la secuencia de referencia de Cambridge (rCRS) [73]. Los haplogrupos mitocondriales fueron clasificados de acuerdo a la nomenclatura reportada previamente [74–77] y comparadas con la herramienta

6.11 Cuantificación del número de copias del mtDNA

Se determinó la relación del mtDNA con respecto al DNA nuclear para representar el número de copias relativo de mtDNA. Los ensayos se realizaron por PCR en tiempo real en un sistema de PCR en tiempo real StepOne (Thermo Fisher Scientific) utilizando SYBR® Green qPCR Mastermix (cat. No. 4309155, Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron por triplicado con cada iniciador mitocondrial y nuclear: mtADN humano (tRNA humano leucina 1 + terminador de transcripción + secuencia similar a 5S) y ADN nuclear humano (ADN ribosómico de 18 segundos) como se ha descrito anteriormente [70]. Las condiciones de la reacción fueron: paso de activación de Hot Start por 5 min a 94 °C seguido por 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C, y 30 s a 72 °C. Los valores promedio de los ciclos threshold (Ct) de mtDNA y nDNA se obtuvieron para cada caso. El contenido fue calculado usando el delta Ct (ΔCt) del promedio Ct de mtDNA y nDNA ($\Delta Ct = Ct \text{ nDNA} - Ct \text{ mtDNA}$) en el mismo pozo como un exponente de 2 ($2^{\Delta Ct}$) como se ha reportado previamente [78]. La eficiencia de los iniciadores fue cuantitativamente determinada y estuvo entre 95 % y 110 %.

6.12 Análisis estadístico

Con la finalidad de determinar las diferencias estadísticamente significativas, los datos provenientes de los resultados postransfección de los plásmidos cmvp53ok, svp53lmm y cmvd133 en la línea celular H1299 (niveles de expresión de proteínas, niveles de consumo de glucosa, niveles de secreción de lactato y cambio en el número de copias del mtDNA) fueron analizados por comparación de medias por medio de una ANOVA de una sola vía.

Los datos provenientes de los resultados obtenidos del análisis de las muestras de tejidos tumorales y normales adyacentes fueron analizados en primer lugar por la prueba Kolmogorov-Smirnov para determinar su distribución. Como el resultado distribución indicó que los datos no siguen una distribución normal, las variables fueron analizadas mediante pruebas no paramétricas. Las diferencias entre las medias fueron comparadas usando la prueba de Mann-Whitney *U* para comparar dos grupos, y con la prueba de Kruskal-Wallis para comparar tres o más grupos. Cuando se determinaron diferencias entre los grupos, se realizaron pruebas pos hoc para determinar las diferencias específicas. La correlación entre las variables se realizó mediante la prueba de correlación de Spearman. Todas las pruebas fueron de dos colas considerando un valor de *p* significativo < 0.05. Los análisis se realizaron con los programas GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA) e IBM SPSS Statistics 23 (IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

VII. RESULTADOS

7.1 Transfección y expresión de las isoformas WTp53, $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ en células H1299

Con la finalidad de determinar si los plásmidos *cmvp53_v*, *cmvp53ok*, *svp53lmm* y *cmvd133 α* (descritos en materiales y métodos) expresaban las respectivas isoformas, se procedió a realizar transfecciones en la línea celular H1299 seguido de ensayos de inmunoblot. Se utilizó la línea celular H1299 como modelo de estudio de las isoformas de la proteína p53, debido a que esta línea celular tiene una deleción parcial homocigota del gen *WTp53* y como resultado no expresa la proteína p53. Esta característica convierte a la línea celular H1299 en un modelo ideal para el estudio de variantes de la proteína p53.

Las transfecciones se realizaron con 1 μ g de plásmido y 24 h postransfección se extrajo la proteína para realizar los ensayos de inmunoblot de acuerdo a lo reportado por Marcel et al., 2013 [79]. Se utilizó el anticuerpo primario monoclonal p53 HR231 que reconoce el epítipo 371-380. Como se esperaba, en la figura 7 se observa que el vector vacío (*cmvp53_v*) no expresa ninguna proteína, mientras que los plásmidos *cmvp53ok*, *svp53lmm* y *cmvd133 α* expresan las isoformas WTp53 (53 kDa), $\Delta 40p53\alpha$ (47 kDa) y $\Delta 133p53\alpha$ (35 kDa), respectivamente.

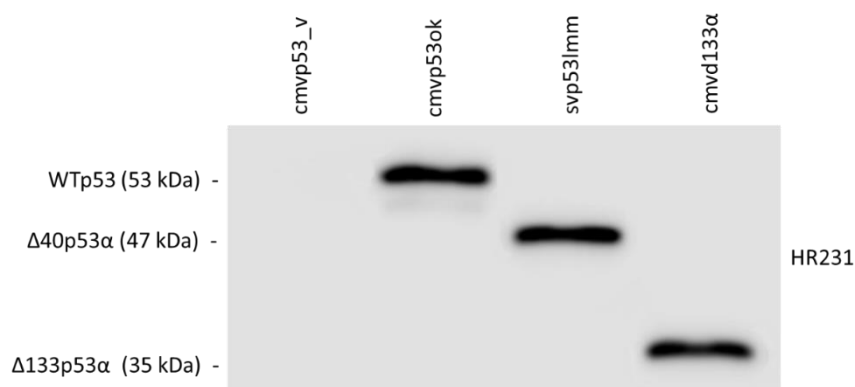


Figura 7. Detección de isoformas de la proteína p53 por inmunoblot. Células H1299 fueron transfectadas con vectores que expresan las isoformas WTp53, $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$. Las proteínas se corrieron en un gel SDS-PAGE al 12 %, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se revelaron con el anticuerpo HR231 24 h postransfección. La banda correspondiente a la isoforma WTp53 se localiza cerca de los 53 kDa, la isoforma $\Delta 40p53\alpha$ se localiza cerca de los 47 kDa y la isoforma $\Delta 133p53\alpha$ se localiza cerca de los 35 kDa. *cmvp53_v*: vector vacío; *cmvp53ok*: vector que expresa la isoforma p53 silvestre; *svp53lmm*: vector que expresa la isoforma $\Delta 40p53\alpha$ y *cmvd133 α* : vector que expresa la isoforma $\Delta 133p53\alpha$; kDa: kilodalton.

7.2 Evaluación del efecto de las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ sobre el consumo de glucosa en células H1299

Debido a que un elevado consumo de glucosa es una característica del efecto Warburg, se procedió a evaluar si las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ ejercen algún efecto en la regulación de este metabolito en la línea celular H1299. Los niveles de consumo de glucosa se evaluaron 24 h postransfección. En la figura 8 se observa que en promedio, los niveles de glucosa fueron de $11.75 \text{ nmol} \times 2e^6$ células después de ser transfectadas con el vector vacío. Por otra parte, como se esperaba por antecedentes previos, mediante la expresión postransfección de la proteína WTp53 se observó una disminución significativa en los niveles de glucosa ($7.28 \text{ nmol} \times 2e^6$ células) con respecto a las células transfectadas con el vector vacío. Cuando se transfectó y expresó la isoforma $\Delta 40p53\alpha$ también se detectó un decremento significativo en los niveles de glucosa ($8.48 \text{ nmol} \times 2e^6$ células) en comparación a las células con el vector vacío y niveles similares a los obtenidos con el control WTp53. Finalmente, tras la expresión de $\Delta 133p53\alpha$, se determinó que esta isoforma no es capaz de disminuir los niveles de glucosa en las células como lo hicieron las isoformas WTp53 y $\Delta 40p53\alpha$, y mostró valores similares ($10.64 \text{ nmol} \times 2e^6$ células) a los obtenidos tras la transfección del vector vacío.

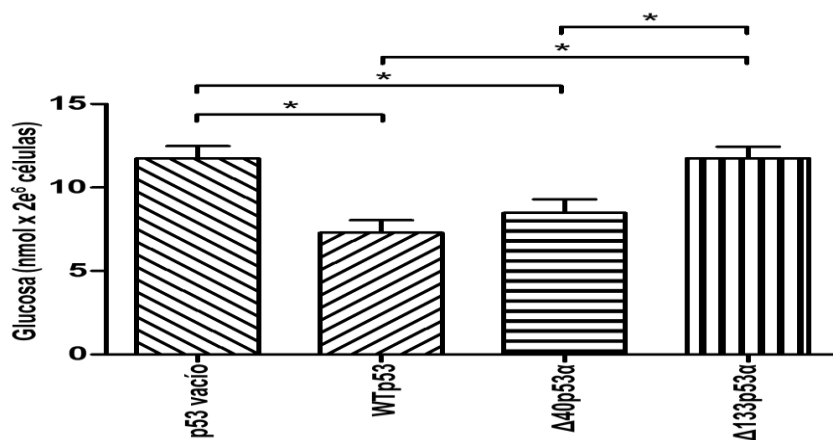


Figura 8. Evaluación del efecto de las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ sobre el consumo de glucosa en células H1299. Células H1299 fueron transfectadas con vectores que expresan las isoformas WTp53, $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$. Los niveles de glucosa fueron evaluados 24 h postransfección mediante un ensayo colorimétrico. Los niveles de glucosa son expresados en $\text{nmol} \times 2e^6$ células. Los datos son mostrados como medias \pm SD de tres experimentos independientes. *: indica la comparación significativa del ANOVA con una $p < 0.05$.

Una vez que se determinó que la isoforma $\Delta 40p53\alpha$ disminuye significativamente el consumo de glucosa, mientras que con la isoforma $\Delta 133p53\alpha$ se mantienen los mismos niveles en comparación con las células con el vector vacío, se decidió investigar si esta regulación se debe a cambios en los transportadores de glucosa (GLUT1 y GLUT4).

Para esto, se realizaron ensayos de inmunoblot con la finalidad de determinar cambios en la expresión de dichas proteínas transportadoras a 24 h postransfección de los vectores de expresión de las isoformas de p53. Se observó que la expresión de la proteína GLUT1 disminuyó significativamente cuando la proteína WTp53 fue transfectada; de la misma forma, los niveles de GLUT1 disminuyeron de forma significativa con la expresión de la isoforma $\Delta 40p53\alpha$, mientras que después de la expresión de las isoforma $\Delta 133p53\alpha$ los niveles se mantuvieron similares a los detectados en las células transfectadas con el vector vacío (Figura 9 A y B). Estos resultados se correlacionan con los niveles de glucosa que se mostraron en el ensayo colorimétrico anterior.

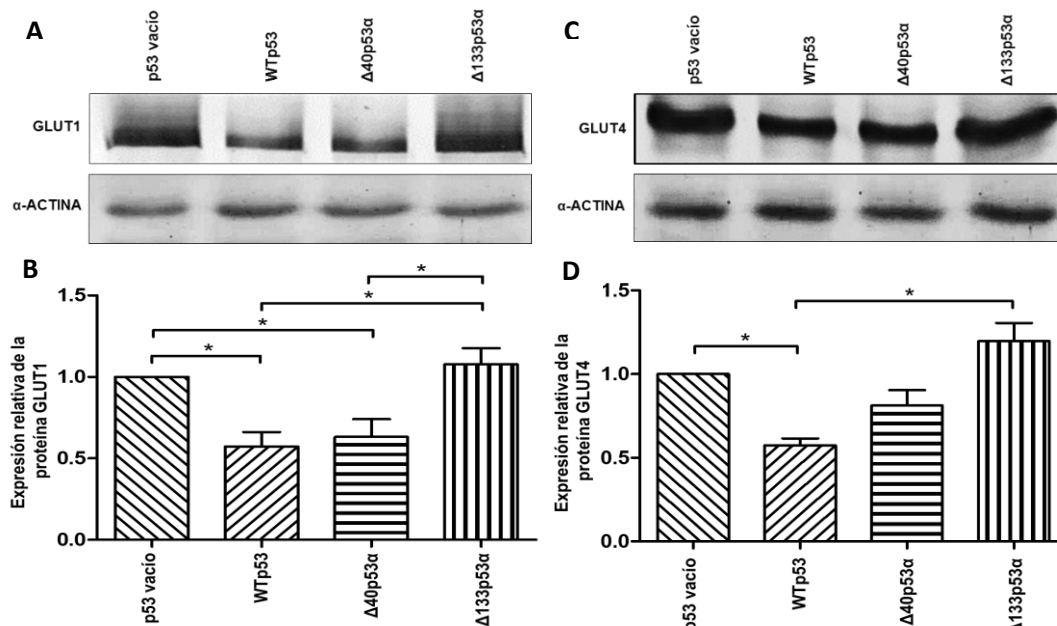


Figura 9. Evaluación del efecto de las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ sobre los niveles de expresión de los transportadores GLUT1 y GLUT4 en células H1299.

Células H1299 fueron transfectadas con vectores que expresan las isoformas WTp53, $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$. Los niveles de expresión fueron evaluados 24 h postransfección.

A) Las proteínas se corrieron en un gel SDS-PAGE al 12 %, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se revelaron con el anticuerpo anti-GLUT1 (A-4). B) Gráfica de la expresión relativa de los niveles de la proteína GLUT1 normalizada con α -actina. C) Las proteínas se trataron como en A pero se revelaron con el anticuerpo anti-GLUT4 (IF8). D) Gráfica de la expresión relativa de los niveles de la proteína GLUT4 normalizada con α -actina. Los datos son mostrados como medias \pm SD de tres experimentos independientes. *: indica la comparación significativa del ANOVA con una $p < 0.05$.

Con respecto al transportador GLUT4, únicamente se observó una disminución significativa en la expresión de GLUT4 después de la expresión de control positivo WTP53 en comparación con las células con el vector vacío. Aunque se observó una ligera disminución en la expresión de GLUT4 después de la transfección y expresión de $\Delta 40p53\alpha$, esta no fue estadísticamente significativa. Al igual que se observó con la expresión de GLUT1, la expresión de la isoforma $\Delta 133p53$ tampoco disminuyó la expresión de GLUT4 (Figura 9 C y D).

7.3 Evaluación del efecto de las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ sobre la excreción de lactato en células H1299

Después de observar que los niveles de glucosa y la expresión de la proteína GLUT1 son regulados por la isoforma $\Delta 40p53\alpha$, mientras que la isoforma $\Delta 133p53\alpha$ no parece ejercer ningún efecto, se decidió evaluar si estas isoformas regulan la excreción de lactato al medio extracelular, ya que elevados niveles de lactato es otro marcador del efecto Warburg.

Como se muestra en la figura 10, con la expresión del control positivo WTP53 se observó una disminución significativa en los niveles de la concentración de lactato secretadas al medio extracelular (9.56 ± 1.41 mM) en comparación con los niveles obtenidos a partir del medio extracelular de las células transfectadas con el vector vacío (14.03 ± 1.09 mM). A diferencia de los resultados obtenidos en la medición del consumo de glucosa, la isoforma $\Delta 40p53\alpha$ no disminuyó de forma significativa la concentración de lactato (12.20 ± 1.45), y tras la expresión de la isoforma $\Delta 133p53\alpha$ la concentración de lactato se mantuvo similar a los obtenidos en las células con el vector vacío (14.47 ± 1.07 mM).

Después de determinar que la concentración de lactato en el medio extracelular no cambia significativamente después de la transfección de los vectores que expresan las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$, se realizaron ensayos de inmunoblot para determinar si a nivel de las proteínas transportadoras de lactato existían cambios en los niveles de expresión. Estos ensayos se realizaron 24 h postransfección utilizando los anticuerpos MCT1 (H-1), MCT4 (D-1), para detectar los transportadores de lactato 1 y 4 respectivamente.

En la figura 11 A y B se muestra que tanto la isoforma WTP53 como $\Delta 40p53\alpha$ lograron disminuir significativamente los niveles de expresión de la proteína del transportador MCT1 en comparación con las células transfectadas con el vector vacío, mientras que la isoforma $\Delta 133p53\alpha$ no indujo cambios en la expresión de MCT1. Con respecto al transportador MCT4, se observó que ninguna isoforma redujo los niveles de expresión del transportador en comparación con los provenientes de células transfectadas con el vector vacío (Figura C y D).

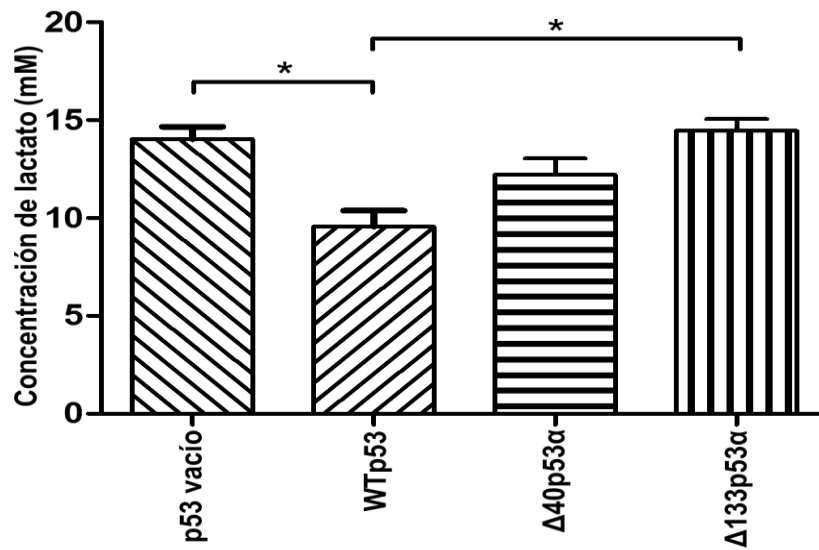


Figura 10. Evaluación del efecto de las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ sobre la excreción de lactato en células H1299. Células H1299 fueron transfectadas con vectores expresando las isoformas WTp53, $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$. La concentración de lactato fue evaluada 24 h postransfección mediante un ensayo colorimétrico. La concentración de lactato es expresada en mM. Los datos son mostrados como medias \pm SD de tres experimentos independientes. *, indica la comparación significativa del ANOVA con una $p < 0.05$.

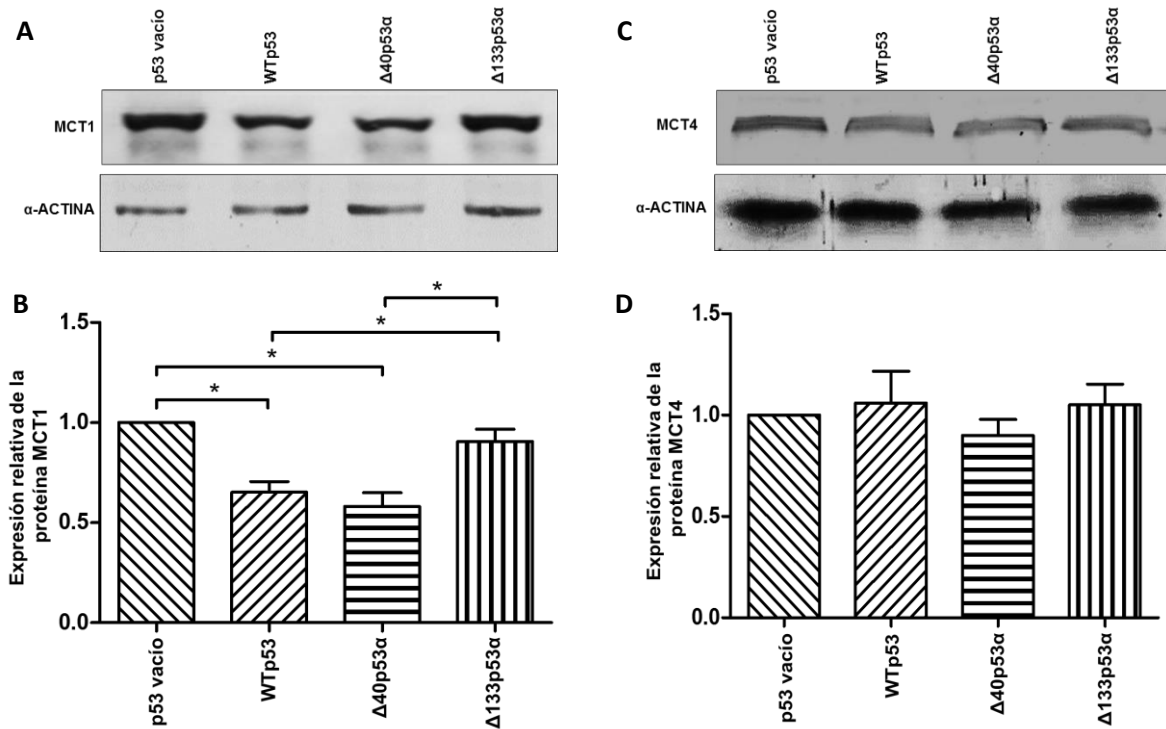


Figura 11. Evaluación del efecto de las isoformas Δ 40p53 α y Δ 133p53 α sobre los niveles de expresión de los transportadores MCT1 y MCT4 en células H1299. Células H1299 fueron transfectadas con vectores expresando las isoformas WTp53, Δ 40p53 α y Δ 133p53 α . Los niveles de expresión fueron evaluados 24 h postransfección. A) Las proteínas se corrieron en un gel SDS-PAGE al 12 % y posteriormente, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se revelaron con el anticuerpo anti-MCT1 (H-1). B) Gráfica de la expresión relativa de los niveles de la proteína MCT1 normalizada con α -actina. C) Las proteínas se trataron como en A pero con el anticuerpo anti-MCT4 (D-1). Gráfica de la expresión relativa de los niveles de la proteína MCT4 al ser normalizada con α -actina. Los datos son mostrados como medias \pm SD de tres experimentos independientes. *: indica la comparación significativa del ANOVA con una $p < 0.05$. **: indica la comparación significativa del ANOVA con una $p < 0.01$.

7.4 Evaluación de los niveles de expresión de proteínas involucradas en el metabolismo celular en células H1299

Una vez que se determinó el efecto de las isoformas Δ 40p53 α y Δ 133p53 α en la regulación de la glucosa y lactato a nivel de metabolito y proteína, se continuó con la evaluación de la expresión de otra proteína involucrada en la regulación del metabolismo glucolítico (ENO-1A); además de tres proteínas involucradas en el metabolismo mitocondrial (PDK2, PDH-E1 α y AIF).

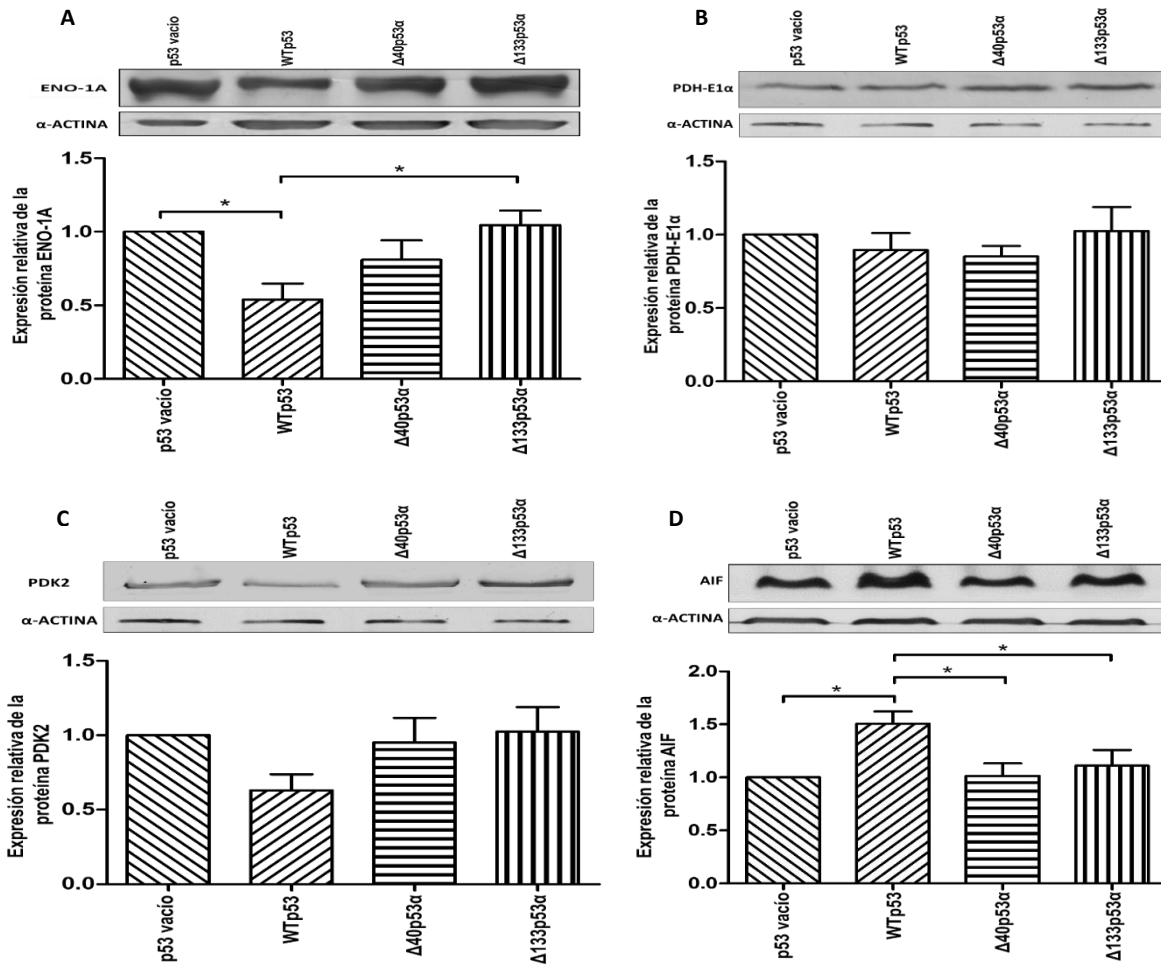


Figura 12. Evaluación del efecto de las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ sobre los niveles de expresión de las proteínas ENO-1A, PDH-1E α , PDK2 y AIF en células H1299. Células H1299 fueron transfectadas con vectores expresando las isoformas WTp53, $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$. Los niveles de expresión fueron evaluados 24 h postransfección. En la parte superior de cada panel se muestra el inmunoblot y en la parte inferior la gráfica de la expresión relativa de cada proteína normalizada con α -actina. Las proteínas se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12 % y posteriormente reveladas con los siguientes anticuerpos específicos: A) anti-ENO-1A. B) anti-PDH-E1 α (D-6). C) anti-PDK2 (3F2D7). D) anti-AIF (B-9). Los datos son mostrados como medias \pm SD de tres experimentos independientes. *: indica la comparación significativa del ANOVA con una $p < 0.05$.

En la figura 12 se muestran los inmunoblots de las proteínas en estudio, así como las gráficas con la expresión relativa de cada una. Después de la transfección con cada una de las isoformas, se observó que la proteína ENO-1A disminuyó de forma significativa únicamente con la expresión del control positivo WTp53 en comparación con las células con el vector vacío, mientras que las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ no generaron cambios significativos sobre los niveles de enolasa (Figura 12A).

Con respecto a la proteína del metabolismo mitocondrial PDH-1E α , no se observó ningún cambio en la expresión de la proteína con ninguna de las isoformas (WTP53, Δ 40p53 α y Δ 133p53 α) como se observa en la figura 12B. En el caso de la proteína PDK2 se observó una disminución únicamente al expresarse la proteína control WTP53 (Figura 12 C); sin embargo la disminución no fue significativa. Mientras que en la proteína AIF, se indujo únicamente un incremento significativo al expresarse el control positivo WTP53, en tanto que las isoformas Δ 40p53 α y Δ 133p53 α no provocaron cambios significativos en las proteínas PDK2 ni AIF en comparadas con los niveles de proteína de las células con el vector vacío (Figura 12 C y D).

7.5 Evaluación del número de copias de mtDNA en células H1299

Otra característica del efecto Warburg es la disminución de la respiración mitocondrial y una manera indirecta de evaluarlo es midiendo la disminución en el número de copias del mtDNA que al final resulta en la reducción de la actividad de la OXPHOS. Por cual, se decidió cuantificar el número relativo de copias del mtDNA después de la transfección y expresión de las isoformas en estudio (WTP53, Δ 40p53 α y Δ 133p53 α) en células H1299. Las evaluaciones se realizaron 24 h postransfección de nuestros vectores de expresión (cmvp53_v, cmvp53ok, svp53lmm y cmvd133 α).

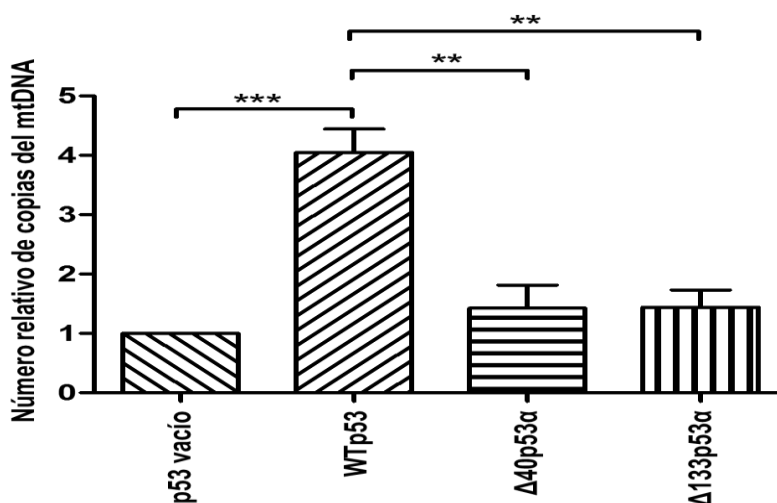


Figura 13. Comparación del número relativo de copias del mtDNA en células H1299 que expresan las isoformas WTP53, Δ 40p53 α y Δ 133p53 α . Células H1299 fueron transfectadas con vectores cmvp53_v, cmvp53ok, svp53lmm y cmvd133 α . El número de copias fue evaluado 24 h postransfección por ensayos de PCR en tiempo real por el método delta CT. Los datos son mostrados como medias \pm SD de tres experimentos independientes. *, indica la comparación significativa del ANOVA con una $p < 0.05$. **, indica la comparación significativa del ANOVA con una $p < 0.01$.

En la figura 13 se observa que después de la expresión de la proteína control WTp53 se genera un aumento de cinco veces el número de copias del mtDNA en comparación con las células con el vector vacío. Al expresarse las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ se observa un ligero incremento en el número de copias en comparación de las células con el vector vacío; sin embargo, no fue estadísticamente significativo.

7.6 Identificación de isoformas de la proteína p53 en tejido provenientes de pacientes con cáncer de mama

Después de analizar *in vitro* el efecto de las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ sobre el metabolismo energético en la línea celular H1299, se decidió realizar un estudio piloto con muestras provenientes de pacientes con cáncer de mama. Esto con la finalidad de evaluar por inmunoblot si las isoformas $\Delta 40p53\alpha$, $\Delta 133p53\alpha$, p53 β/γ son expresadas en TCM y TNA; además de evaluar si estas isoformas se encuentran asociadas a las características clínicas.

Los resultados se sometieron para su publicación a la revista “Cancer Genetics”, Elsevier con el título “Expression of the $\Delta 40p53\alpha$ and $\Delta 133p53\alpha$ isoforms are associated with age, body mass index and receptor status in Mexican women with breast cancer” [80]. Al final de la tesis se anexa el resumen del artículo enviado.

7.7 Asociación del número de copias del mtDNA con las características clínicas y los haplogrupos mitocondriales

Con la finalidad de determinar si existen diferencias del contenido del mtDNA entre los tejidos tumorales y tejidos adyacentes para posteriormente determinar su asociación con las características clínicas y haplogrupos mitocondriales amerindios (A2, B2, B4, C1 y D1), se realizó la cuantificación relativa del número de copias por el método delta CT. De las 92 muestras de cada tipo de tejido (TCM y TNA), solo se pudo determinar el número de copias del mtDNA de 82 muestras tanto de TCM como de TNA, con las que se realizaron los correspondientes análisis.

Los resultados mostraron que el número de copias del mtDNA disminuyó significativamente en el TCM en comparación al TNA ($p = 0.010$). Además, se observó una disminución significativa en el número de copias del mtDNA en TCM y TNA de mujeres mayores a 50 años en comparación con el TNA de mujeres menores a 50 años ($p = 0.032$ y $p = 0.037$, respectivamente).

Tanto en el TNA como en el TCM del grupo con la categoría de posmenopausia y en el TCM del grupo en la categoría de premenopausia, el número de copias del mtDNA disminuyó significativamente en comparación al TNA del grupo en premenopausia ($p = 0.011$, $p = 0.010$ y $p = 0.018$; respectivamente). Asimismo, hubo una disminución significativa del número de copias del mtDNA en el grupo de TCM de las muestras clasificadas con carcinoma ductal invasivo I-III (CDI-I, CDI-II e CDI-III) y con CDI-II el grupo de TNA en comparación con las muestras clasificadas como CDI-I del grupo de TNA ($p = 0.025$, $p = 0.022$ y $p = 0.031$ y $p = 0.020$; respectivamente).

Asimismo, se encontró una correlación negativa entre el número de copias del mtDNA y los subtipos histológicos ($r_s = -0.141$; $p = 0.047$), el estatus de menopausia ($r_s = -0.286$; $p = 0.009$), y la edad ($r_s = -0.304$; $p = 0.005$). En contraste, se observó una correlación negativa entre la proporción TCM/TNA y la edad ($r_s = -0.285$; $p = 0.009$).

Por otra parte, también se observó que el número de copias del mtDNA en el TCM de pacientes con haplogrupo B2 disminuyó de forma significativa en comparación con pacientes con haplogrupo D1 ($p = 0.01$); además, en el TCM de pacientes con haplogrupo C1 hubo una disminución significativa del número de copias del mtDNA en comparación con su contraparte en el grupo de TNA ($p = 0.006$) y con muestras de TCM pertenecientes al haplogrupos A2 y D1 ($p = 0.01$ y $p = 0.03$; respectivamente).

De forma adicional, se analizaron las variantes genéticas de la región D-loop del genoma mitocondrial y se determinó que el número de copias del mtDNA disminuyó

de forma significativa en las secuencias que presentan tres deleciones en las posiciones de los nucleótidos A249del, A290del y A291del, además del polimorfismo C16327T con el mismo valor de P ($p = 0.019$) para las cuatro variantes. Por el contrario, el número de copias del mtDNA aumentó significativamente en las muestras que contienen los polimorfismos C16111T, G16319A o T16362C ($p = 0.021$, $= 0.048$ y $= 0.001$; respectivamente).

Los datos de esta sección son presentados en el artículo titulado “Reduced mitochondrial DNA copy number is associated with the haplogroup, and some clinical features of breast cancer in Mexican patients” [81], aceptado en la revista: GENE, Elsevier. El PDF de la última versión se anexa al final de la tesis.

VIII. DISCUSIÓN

Estudios recientes han demostrado que existen al menos 12 isoformas de la proteína p53 (WTP53 o p53 α , p53 β , p53 γ , Δ 40p53 α , Δ 40p53 β , Δ 40p53 γ , Δ 133p53 α , Δ 133p53 β , Δ 133p53 γ , Δ 160p53 α , Δ 160p53 β , Δ 160p53 γ) generadas mediante inicios alternativos de la traducción, uso de promotores alternativos y procesamientos alternativos. Asimismo, se ha observado que la expresión de algunas de estas isoformas están involucradas en algunos procesos carcinogénicos tales como invasión, metástasis, proliferación, inflamación, evasión de la apoptosis y angiogénesis [49,53,82], o procesos protectores como la inducción de genes asociados a apoptosis en células cancerosas [45,83,84]. Los mecanismos moleculares por los cuales estas isoformas están asociadas con procesos carcinogénicos aún no han sido descritos claramente, aunque se sugiere que debido a la pérdida de dominios funcionales, se originan defectos en la unión al DNA o en la formación de complejos proteicos responsables del desarrollo de células malignas al generar un efecto dominante negativo o ganancia de alguna función [83]. Sin embargo, al día de hoy no existen reportes que describan el efecto de las isoformas Δ 40p53 α , Δ 133p53 α sobre el metabolismo energético de células cancerosas; en el presente trabajo se evaluó dicho efecto usando la línea celular de cáncer de pulmón H1299.

Estudios previos han demostrado que la proteína WTP53 es capaz de revertir el efecto Warburg al disminuir el consumo de glucosa por la subregulación principalmente de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 [15]. En el presente trabajo se estudió el efecto que tienen las isoformas Δ 40p53 α y Δ 133p53 α sobre la regulación de glucosa en comparación a la proteína de referencia WTP53.

Los resultados mostraron que la isoforma Δ 40p53 α disminuye el consumo de glucosa en la línea celular H1299, lo cual podría ser el resultado de la disminución de la expresión del transportador GLUT1, el cual también se encontró disminuido a nivel de proteína; mientras que la isoforma Δ 133p53 α no ejerció ningún efecto en la regulación de glucosa a nivel de metabolito ni de transportadores de glucosa (GLUT1 y GLUT4) mostrando un comportamiento similar al de las células con el vector vacío las cuales son nulas de la proteína WTP53. Es importante considerar que además de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4, existen otros transportadores que no son regulados por la vía de p53, que podrían seguir importando glucosa al medio intracelular a pesar de que GLUT1 y GLUT4 sean regulados [85].

El efecto positivo que se observó tras la expresión de la isoforma Δ 40p53 α al disminuir el consumo de glucosa, sugiere que esta isoforma juega un papel

importante en la reversión del efecto Warburg al igual que lo hace la proteína WTP53. Este efecto positivo puede deberse a que la isoforma $\Delta 40p53\alpha$ pierde el sitio de unión a MDM2 que se encuentra en el dominio TAD-1 de la forma WTP53, lo que evita su degradación proteosomal; además, se ha observado que aunque la isoforma $\Delta 40p53\alpha$ pierde el dominio TAD-1, conserva el dominio TAD-2, el cual se ha demostrado que es capaz de regular la expresión de genes después de ser transfectada y expresada [86]. También se ha observado que $\Delta 40p53\alpha$ induce la expresión y represión de genes blanco de WTP53 involucrados en clonogenicidad, senescencia y apoptosis, mostrando así un efecto supresor de tumor [33,46]; por tal motivo, esta isoforma puede ser también capaz de regular el consumo de glucosa al regular a nivel transcripcional por lo menos al transportador GLUT1 como lo hemos reportado en el presente trabajo.

Por otra parte, el hecho de que la isoforma $\Delta 133p53\alpha$ no ejerza ningún efecto sobre la regulación de glucosa puede deberse a que carece de los dos dominios de transactivación (TAD-1 y TAD-2), pero sigue conservando parte de su dominio de unión a DNA, lo que hace que sea capaz de competir con WTP53 por regiones reguladoras de los promotores de los transportadores GLUT1 y GLUT4, evitando así que sean regulados por WTP53. Este efecto se ha observado en la represión de genes que inducen senescencia, donde $\Delta 133p53\alpha$ funciona como un dominante negativo de WTP53 en células humanas pluripotentes [87].

Diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que altos niveles de glucosa promueven proliferación celular y metástasis mediante la sobrerregulación del sustrato del receptor de la insulina (IRS1, por sus siglas en inglés) y la activación de la vía Ras/Raf/ERK [88,89]. Por tal motivo, el hecho de que la isoforma $\Delta 40p53\alpha$ disminuya los niveles de glucosa podría conferirle características antioncogénicas, mientras que la isoforma $\Delta 133p53\alpha$ que no regula los niveles de glucosa podría conferirle características oncogénicas.

Se sabe que la proteína WTP53 también es capaz de revertir el efecto Warburg al disminuir la producción y secreción de lactato al medio extracelular [25,26]. Observamos que tras la expresión de las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$, a pesar de que hubo una disminución en la expresión de la proteína del transportador MCT1 mediada por la isoforma $\Delta 40p53\alpha$, no hubo una disminución significativa en la secreción de lactato al medio extracelular. Esto sugiere que a pesar de que el transportador MCT1 disminuye por la expresión de $\Delta 40p53\alpha$, existen otros transportadores de lactato que no son regulados por la vía de p53, y por lo tanto se sigue secretando lactato al medio extracelular [23].

Se ha observado que en este tipo de microambientes ácidos, elevados niveles de lactato reducen el pH extracelular entre 6.0 – 6.5 [90], activando señales que

inducen angiogénesis a través de la activación de VEGF/VEGFR2 [91,92]. Asimismo, se induce una inmunosupresión al afectarse el funcionamiento de células inmunes como la proliferación de células T, reducción de la producción de citoquinas, y disminución de la actividad citotóxica de células NK y células T CD8⁺ [93–95]; además de inducir señales de dolor en personas con cáncer [96].

Otra proteína involucrada en potenciar el metabolismo glucolítico en los procesos carcinogénicos es ENO-1A, la cual es una enzima glucolítica clave que cataliza la deshidratación de 2-D-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato y juega un papel importante en los procesos de tumorigénesis, invasión y metástasis [97–99]. En el presente trabajo se observó que ninguna de las isoformas evaluadas ($\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$) indujo cambios en la expresión de ENO-1A. En un estudio previo se observó que la enzima ENO-1A disminuye en ratones WTp53, mientras que aumenta en ratones $\Delta 122p53$, los cuales expresan una isoforma equivalente a $\Delta 133p53$ humana [19].

Se ha descrito que en el efecto Warburg existe una reprogramación metabólica en la que se inhibe o disminuye el metabolismo mitocondrial. Sin embargo, se ha reportado que la proteína WTp53 es capaz de revertir esta reprogramación metabólica al regular negativamente la proteína piruvato deshidrogenasa quinasa 2 (PDK2). Durante el efecto Warburg, la enzima PDK2 inactiva al complejo PDH con la finalidad de favorecer la vía de transformación de piruvato a lactato. Por tal motivo, cuando WTp53 inactiva a la enzima PDK2, el complejo PDH es activado para inducir la conversión del piruvato en acetil-CoA, el cual a su vez alimenta el ciclo de ácidos tricarbónicos y se favorece la OXPHOS [27,100]. Nosotros observamos que ni la isoforma $\Delta 40p53\alpha$ ni $\Delta 133p53\alpha$ fueron capaces de regular la expresión de las proteínas PDK2 ni PDH-E1 α .

Otra proteína que tampoco fue regulada por las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ fue el factor inductor de apoptosis AIF. Se ha observado que cuando AIF disminuye se induce una deficiencia en la OXPHOS y un metabolismo glucolítico aumentado [101]. Por el contrario, se sabe que WTp53 puede inducir la activación de AIF, la cual es importante para una eficiente OXPHOS, muy posiblemente por participar en el correcto ensamblaje y funcionamiento del complejo respiratorio mitocondrial I [102], además de inducir apoptosis independiente de caspasas en un microambiente tumoral citotóxico al unirse al DNA y estimular una actividad DNasa, condensar la cromatina y provocar una fragmentación del DNA a gran escala (50 kb) [29,103,104], además de inhibir metástasis de células cancerígenas *in vitro* y en xenoinjertos implantados ortotópicamente [105].

Como se observa en este trabajo, las proteínas GLUT4, MCT4, ENO-1A, PDK2, PDH-E1 α y AIF no fueron reguladas por las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ ni $\Delta 133p53\alpha$. Esto puede deberse a que las isoformas de p53 tienen una preferencia diferencial en la

unión a distintos promotores blanco de la proteína WTP53. Por ejemplo, se sabe que a pesar de que estructuralmente la isoforma $\Delta 133p53\alpha$ carece del bucle L1 del DBD que es esencial para la unión al DNA, conserva la hélice H2 del DBD altamente conservada, la cual se une al surco principal del DNA, además de conservar el dominio C-terminal requerido para la difusión lineal de p53 [106–108], lo que sugeriría que $\Delta 133p53\alpha$ se puede unir de manera competitiva a diferentes secuencias blanco de p53, aunque al carecer de los dos dominios de transactivación no es capaz de regular a los genes a los que se une [87].

En el caso de la isoforma $\Delta 40p53\alpha$ se ha observado que a pesar de carecer del dominio TAD-1, al conservar el dominio TAD-2 es capaz de ejercer el mismo efecto que la proteína WTP53, tal como su actividad proapoptótica, ya que dentro del dominio TAD-2 se conservan los residuos 53 y 54 que se son críticos para inducir la apoptosis [45,86]. Aunque, también se ha reportado que $\Delta 40p53\alpha$ puede actuar también como dominante negativo de WTP53 al inhibir su actividad transcripcional y alterar la actividad supresora de tumor como WTP53. Esto sugiere que los residuos que se conservan en el dominio TAD-2 (43-92) o los residuos perdidos en el dominio TAD-1 (1-42), pueden definir si regulan o no transcripcionalmente a los genes blanco de WTP53. Por lo tanto, es posible que el dominio TAD-2 sea suficiente para regular la expresión de GLUT1 y MCT1, mientras que el dominio TAD-1 puede ser indispensable para la regulación de GLUT4, MCT4, ENO-1A, PDK2 y AIF, y por lo tanto no son regulados por las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$.

Otra característica que se evaluó en la línea celular H1299 fue el cambio en el número de copias del mtDNA, ya que existen evidencias que muestran que la OXPHOS se encuentra disminuida por el decremento en el número de copias del mtDNA en distintos tipos de cáncer. Esto va de acuerdo con la reducción en la replicación del genoma mitocondrial y la consecuente disminución en la tasa de traducción de las proteínas de los complejos de la respiración mitocondrial [62,63,109,110]. Se han reportado antecedentes sobre la pérdida de la función de la OXPHOS asociada con un efecto antiapoptótico en la línea celular derivada de osteosarcoma, mientras que una eficiente actividad de OXPHOS induce de forma significativa la activación de Bax y Bak originando muerte celular en las líneas celulares MCF-7 y HepG2. Asimismo, se ha sugerido que un desbalance en la actividad de la OXPHOS contribuye al desarrollo de cáncer [64,65,111].

Observamos que no existe efecto de las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ sobre la regulación del número de copias del mtDNA en células H1299. Otros estudios han observado que la proteína WTP53 se une al promotor de TFAM provocando un incremento en el número de copias del mtDNA, mientras que reducidos niveles de WTP53 y TFAM generan un decremento en el contenido de mtDNA, efecto que se asocia a distintos tipos de cáncer [30,112,113]. Asimismo, se observó que el

incremento en el contenido de mtDNA en ratones p53+/+ comparado con ratones p53-/- fue mayor en el grupo de músculo esquelético aeróbico en comparación con el grupo de músculo esquelético glucolítico [112]. Hasta el momento no existen reportes que hayan determinado cuales son los aminoácidos de los motivos de transactivación de la proteína WTp53 que interaccionan con el promotor de TFAM; sin embargo, nuestros resultados pueden sugerir que ambos dominios TAD-1 y TAD-2 (ausente en $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$, respectivamente) son importantes para inducir la transcripción de la proteína TFAM.

IX. CONCLUSIONES

1. Los resultados sugieren que la isoforma $\Delta 40p53\alpha$ podría estar participando en la regulación del efecto Warburg al disminuir el consumo de glucosa y secreción de lactato por medio de la represión de los transportadores GLUT1 y MCT1, respectivamente.
2. Debido a que la isoforma $\Delta 40p53\alpha$ es capaz de regular la expresión de los transportadores GLUT1 y MCT1, se sugiere que el dominio TAD-2 de $\Delta 40p53\alpha$ es suficiente para la regulación de los mismos.
3. Es posible que el dominio TAD-1 de la isoforma $\Delta 40p53\alpha$ sea indispensable para la regulación de las proteínas GLUT4, MCT4, ENO-1A, PDK2, PDH-E1 α , AIF y TFAM; esto debido a que no se observó efecto sobre la regulación de las mismas a diferencia de la proteína WTP53.
4. La isoforma $\Delta 133p53\alpha$ podría estar participando como un regulador negativo de la proteína WTP53 debido a que carece de los dos dominios de transactivación (TAD-1 y TAD-2) característicos de WTP53, pero conserva su dominio de unión a DNA y consecuentemente favorecer el efecto Warburg.
5. La expresión proteica de la isoforma $\Delta 40p53\alpha$ es mayor en TNA en comparación al TCM; posiblemente para evitar que las células del TNA se transformen en células cancerosas gracias a su efecto apoptótico en este tipo de células.
6. La expresión proteica de la isoforma $\Delta 133p53\alpha$ es más elevada en TCM en comparación al TNA; además de asociarse con el aumento de la edad y del IMC. Este aumento en la expresión de $\Delta 133p53\alpha$ posiblemente ocasiona una competencia con la proteína WTP53 evitando que realice sus funciones supresoras de tumor.
7. La disminución del número de copias del mtDNA detectada en las muestras de TCM en mujeres mayores a 50 años, en mujeres con obesidad y en muestras clasificadas como subtipos histológicos CDI-I, II y III posiblemente cause una disfunción en la actividad de la OXPHOS asociada al desarrollo y progresión de cáncer.
8. Las variantes A249del, A290del, A291del y C16327T presentes en las muestras de TCM, posiblemente afecten la unión de la maquinaria de replicación mitocondrial resultando en la disminución del número de copias del mtDNA.
9. Las muestras de TCM que contienen las variantes C16111T, G16319A y T16362C presentan un mayor contenido de mtDNA. Esto puede resultar en una mejor actividad de OXPHOS haciéndolas más sensibles a agentes quimioterapéuticos.

Conclusión final

Todos los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que las isoformas $\Delta 40p53\alpha$, $\Delta 133p53\alpha$, así como la disminución en el número de copias del mtDNA juegan un papel importante en procesos carcinogénicos tanto en la línea celular H1299 como en tejidos de cáncer de mama. Por tal motivo, podrían ser usados como marcadores moleculares de progresión, y respuesta a tratamientos anticancerígenos.

X. PERSPECTIVAS

1. Realizar los ensayos para la evaluación del metabolismo glucolítico y mitocondrial en células H1299 transfectando distintas combinaciones de las isoformas de la proteína p53 (WTp53, $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$).
2. Realizar ensayos de unión entre las isoformas $\Delta 40p53\alpha$ y $\Delta 133p53\alpha$ con los promotores de los genes *SLC2A1*, *SLC2A4*, *SLC16A1*, *SLC16A4*, *ENO-1A*, *PK2*, *PDH* and *AIFM1* con la finalidad de evaluar la importancia de los dominios TAD-1 y TAD-2 en la regulación de los mismos.
3. Realizar un estudio de asociación con un mayor número de individuos y en otras poblaciones mexicanas. Esto con objetivo de validar los resultados obtenidos de la asociación de las isoformas $\Delta 40p53\alpha$, $\Delta 133p53\alpha$ y p53 β/γ y el número de copias del mtDNA con las características clínicas y haplogrupos amerindios.
4. Realizar células híbridas que contengan los haplogrupos amerindios más frecuentes en la población mexicana, con la finalidad de evaluar *in vitro* los mecanismos moleculares de regulación en las tasas de replicación, transcripción y traducción, así como sus efectos en el desarrollo y progresión del cáncer.
5. Realizar estudios *in vitro* con células híbridas que contengan los haplogrupos mitocondriales amerindios para evaluar sus efectos sobre el metabolismo mitocondrial asociado a cáncer.
6. Realizar ensayos de unión entre los elementos de las maquinarias de replicación y transcripción mitocondrial con la región D-loop del genoma mitocondrial que contengan las variantes asociadas con cambios en el número de copias del mtDNA reportadas en el presente trabajo (A249del, A290del, A291del, C16327, C16111T, G16319A y T16362C).

XI. REFERENCIAS

- [1] Hanahan D, Weinberg RA. 2000-Hanahan.pdf. *Cell* 2000;100:57–70. doi:10.1007/s00262-010-0968-0.
- [2] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011;144:646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [3] Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett* 2015;356:156–64. doi:10.1016/j.canlet.2014.04.001.
- [4] Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* (80-) 1956;123:309–14. doi:10.1126/science.123.3191.309.
- [5] Heiden MG Vander, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* (80-) 2009;324:1029–33. doi:10.1126/science.1160809.
- [6] Koppenol WH, Bounds PL, Dang C V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011;11:325–37. doi:10.1038/nrc3038.
- [7] Upadhyay M, Samal J, Kandpal M, Singh OV, Vivekanandan P. The Warburg effect: insights from the past decade. *Pharmacol Ther* 2013;137:318–30. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.11.003.
- [8] Surget S, Khoury MP, Bourdon JC. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: A clinical perspective. *Onco Targets Ther* 2013;7:57–67. doi:10.2147/OTT.S53876.
- [9] Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 1997;420:25–7. doi:10.1016/s0014-5793(97)01480-4.
- [10] Meek DW, Anderson CW. Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a000950. doi:10.1101/cshperspect.a000950.
- [11] Vousden KH, Lane DP. P53 in Health and Disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:275–83. doi:10.1038/nrm2147.
- [12] el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* 1992;1:45–9. doi:10.1038/ng0492-45.
- [13] Biegging KT, Mello SS, Attardi LD. p53-mediated tumour suppression; review 2014. *Nat Rev Cancer* 2014;14:359–70. doi:10.1038/nrc3711.

- [14] Liu J, Zhang C, Hu W, Feng Z. Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism. *Cancer Lett* 2015;356:197–203. doi:10.1016/j.canlet.2013.12.025.
- [15] Schwartzenberg-Bar-Yoseph F, Armoni M, Karnieli E. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res* 2004;64:2627–33.
- [16] Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, Tanaka N. p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF- κ B pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol* 2008;10:611–8. doi:10.1038/ncb1724.
- [17] Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MNC, Nakano K, Bartrons R, et al. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 2006;126:107–20. doi:10.1016/j.cell.2006.05.036.
- [18] Kondoh H, Leonart ME, Gil J, Wang J, Degan P, Peters G, et al. Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res* 2005;65:177–85.
- [19] Sawhney S, Hood K, Shaw A, Braithwaite AW, Stubbs R, Hung NA, et al. Alpha-Enolase Is Upregulated on the Cell Surface and Responds to Plasminogen Activation in Mice Expressing a $\Delta 133p53\alpha$ Mimic. *PLoS One* 2015;10:e0116270. doi:10.1371/journal.pone.0116270.
- [20] Chung FZ, Tsujibo H, Bhattacharyya U, Sharief FS, LI SS. Genomic organization of human lactate dehydrogenase-A gene. *Biochem J* 1985;231:537–41. doi:10.1042/bj2310537.
- [21] Zhou Y, Niu W, Luo Y, Li H, Xie Y, Wang H, et al. p53/Lactate dehydrogenase A axis negatively regulates aerobic glycolysis and tumor progression in breast cancer expressing wild-type p53. *Cancer Sci* 2019;110:939–49. doi:10.1111/cas.13928.
- [22] Allison SJ, Knight JRP, Granchi C, Rani R, Minutolo F, Milner J, et al. Identification of LDH-A as a therapeutic target for cancer cell killing via (i) p53/NAD(H)-dependent and (ii) p53-independent pathways. *Oncogenesis* 2014;3:e102. doi:10.1038/oncsis.2014.16.
- [23] Hertz L, Dienel GA. Lactate transport and transporters: General principles and functional roles in brains cells. *J. Neurosci. Res.*, vol. 79, 2005, p. 11–8. doi:10.1002/jnr.20294.
- [24] de la Cruz-López KG, Castro-Muñoz LJ, Reyes-Hernández DO, García-Carrancá A, Manzo-Merino J. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Front Oncol* 2019;9. doi:10.3389/fonc.2019.01143.
- [25] Zhou Y, Niu W, Luo Y, Li H, Xie Y, Wang H, et al. p53/Lactate dehydrogenase A axis negatively regulates aerobic glycolysis and tumor progression in breast cancer expressing wild-type p53. *Cancer Sci*

2019;110:939–49. doi:10.1111/cas.13928.

- [26] Boidot R, Vegran F, Meulle A, Le Breton A, Dessy C, Sonveaux P, et al. Regulation of monocarboxylate transporter MCT1 expression by p53 mediates inward and outward lactate fluxes in tumors. *Cancer Res* 2012;72:939–48. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2474.
- [27] Contractor T, Harris CR. p53 negatively regulates transcription of the pyruvate dehydrogenase kinase Pdk2. *Cancer Res* 2012;72:560–7. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1215.
- [28] S M, J-G K, WD P, A W, M B, O G, et al. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* (80-) 2006;312:1650–3.
- [29] Stambolsky P, Weisz L, Shats I, Klein Y, Goldfinger N, Oren M, et al. Regulation of AIF expression by p53. *Cell Death Differ* 2006;13:2140–9. doi:10.1038/sj.cdd.4401965.
- [30] Wen S, Gao J, Zhang L, Zhou H, Fang D, Feng S. p53 increase mitochondrial copy number via up-regulation of mitochondrial transcription factor A in colorectal cancer. *Oncotarget* 2016;7:75981–95. doi:10.18632/oncotarget.12514.
- [31] Shadel GS, Clayton DA. MITOCHONDRIAL DNA MAINTENANCE IN VERTEBRATES. *Annu Rev Biochem* 1997;66:409–35. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.409.
- [32] Lee HC, Li SH, Lin JC, Wu CC, Yeh DC, Wei YH. Somatic mutations in the D-loop and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 2004;547:71–8. doi:10.1016/j.mrfmmm.2003.12.011.
- [33] Yin Y, Stephen CW, Luciani MG, Fåhraeus R. p53 stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products. *Nat Cell Biol* 2002;4:462–7. doi:10.1038/ncb801.
- [34] Ohki R, Kawase T, Ohta T, Ichikawa H, Taya Y. Dissecting functional roles of p53 N-terminal transactivation domains by microarray expression analysis. *Cancer Sci* 2007;98:189–200. doi:10.1111/j.1349-7006.2006.00375.x.
- [35] Fujita K, Mondal AM, Horikawa I, Nguyen GH, Kumamoto K, Sohn JJ, et al. p53 isoforms Delta133p53 and p53beta are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nat Cell Biol* 2009;11:1135–42. doi:10.1038/ncb1928.
- [36] Khoury MP, Bourdon J-C. The Isoforms of the p53 Protein n.d. doi:10.1101/cshperspect.a000927.
- [37] Song W, Huo S, Lü J, Liu Z, Fang X, Jin X, et al. Expression of p53 isoforms in renal cell carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2009;122:921–6.

doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2009.08.008.

- [38] Bourdon J-C, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, et al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* 2005;19:2122–37. doi:10.1101/gad.1339905.
- [39] Silden E, Hjelle SM, Wergeland L, Sulen A, Andresen V, Bourdon JC, et al. Expression of TP53 Isoforms p53 β or p53 γ Enhances Chemosensitivity in TP53null Cell Lines. *PLoS One* 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0056276.
- [40] Bischof K, Knappskog S, Stefansson I, McCormack EM, Trovik J, Werner HMJ, et al. High expression of the p53 isoform γ is associated with reduced progression-free survival in uterine serous carcinoma. *BMC Cancer* 2018;18:684. doi:10.1186/s12885-018-4591-3.
- [41] Ghosh A, Stewart D, Matlashewski G. Regulation of Human p53 Activity and Cell Localization by Alternative Splicing. *Mol Cell Biol* 2004;24:7987–97. doi:10.1128/MCB.24.18.7987-7997.2004.
- [42] Maier B, Gluba W, Bernier B, Turner T, Mohammad K, Guise T, et al. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev* 2004;18:306–19. doi:10.1101/gad.1162404.
- [43] Hofstetter G, Berger A, Berger R, Zorić A, Braicu EI, Reimer D, et al. The N-terminally truncated p53 isoform Δ 40p53 influences prognosis in mucinous ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2012;22:372–9. doi:10.1097/IGC.0b013e31823ca031.
- [44] Hofstetter G, Berger A, Schuster E, Wolf A, Hager G, Vergote I, et al. Δ 133P53 Is an Independent Prognostic Marker in P53 Mutant Advanced Serous Ovarian Cancer. *Br J Cancer* 2011;105:1593–9. doi:10.1038/bjc.2011.433.
- [45] Takahashi R, Markovic SN, Scrable HJ. Dominant effects of Δ 40p53 on p53 function and melanoma cell fate. *J Invest Dermatol* 2014;134:791–800. doi:10.1038/jid.2013.391.
- [46] Ota A, Nakao H, Sawada Y, Karnan S, Wahiduzzaman M, Inoue T, et al. Δ 40P53A Suppresses Tumor Cell Proliferation and Induces Cellular Senescence in Hepatocellular Carcinoma Cells. *J Cell Sci* 2017;130:614–25. doi:10.1242/jcs.190736.
- [47] Hinault C, Kawamori D, Liew CW, Maier B, Hu J, Keller SR, et al. Δ 40 Isoform of p53 controls β -cell proliferation and glucose homeostasis in mice. *Diabetes* 2011;60:1210–22. doi:10.2337/db09-1379.
- [48] Aoubala M, Khoury MP, Fernandes K, Perrier S, Bernard H, Prats A, et al. p53 directly transactivates D 133p53 a , regulating cell fate outcome in response to DNA damage 2011;44:248–58. doi:10.1038/cdd.2010.91.

- [49] Bernard H, Garmy-Susini B, Ainaoui N, Van Den Berghe L, Peurichard A, Javerzat S, et al. The p53 isoform, $\Delta 133p53\alpha$, stimulates angiogenesis and tumour progression. *Oncogene* 2013;32:2150–60. doi:10.1038/onc.2012.242.
- [50] Gong L, Gong H, Pan X, Chang C, Ou Z, Ye S, et al. p53 isoform $\Delta 113p53/\Delta 133p53$ promotes DNA double-strand break repair to protect cell from death and senescence in response to DNA damage. *Cell Res* 2015;25:351–69. doi:10.1038/cr.2015.22.
- [51] Wei J, Noto J, Zaika E, Romero-Gallo J, Correa P, El-Rifai W, et al. Pathogenic bacterium *Helicobacter pylori* alters the expression profile of p53 protein isoforms and p53 response to cellular stresses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:E2543-50. doi:10.1073/pnas.1205664109.
- [52] Nutthasirikul N, Limpai boon T, Leelayuwat C, Patrakitkomjorn S, Jearanaikoon P. Ratio disruption of the $\Delta 133p53$ and TAp53 isoform equilibrium correlates with poor clinical outcome in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Int J Oncol* 2013;42:1181–8. doi:10.3892/ijo.2013.1818.
- [53] Slatter TL, Hung N, Campbell H, Rubio C, Mehta R, Renshaw P, et al. Hyperproliferation, cancer, and inflammation in mice expressing a $\Delta 133p53$ -like isoform 2017;117:5166–78. doi:10.1182/blood-2010-11-321851.The.
- [54] Milićević Z, Bajić V, Živković L, Kasapović J, Andjelković U, Spremo-Potparević B. Identification of p53 and its isoforms in human breast carcinoma cells. *ScientificWorldJournal* 2014;2014:618610–98. doi:10.1155/2014/618698.
- [55] Marcel V, Perrier S, Aoubala M, Ageorges S, Groves MJ, Diot A, et al. $\Delta 160p53$ is a novel N-terminal p53 isoform encoded by $\Delta 133p53$ transcript. *FEBS Lett* 2010;584:4463–8. doi:10.1016/j.febslet.2010.10.005.
- [56] Zong WX, Rabinowitz JD, White E. Mitochondria and Cancer. *Mol Cell* 2016;61:667–76. doi:10.1016/j.molcel.2016.02.011.
- [57] Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 2005;6:389–402. doi:10.1038/nrg1606.
- [58] Kim A. Mitochondrial DNA somatic mutation in cancer. *Toxicol Res* 2014;30:235–42. doi:10.5487/TR.2014.30.4.235.
- [59] Luchini C, Nottegar A, Vaona A, Stubbs B, Demurtas J, Maggi S, et al. Female-specific association among I, J and K mitochondrial genetic haplogroups and cancer: A longitudinal cohort study. *Cancer Genet* 2018;224–225:29–36. doi:10.1016/j.cancergen.2018.04.003.
- [60] Reznik E, Miller ML, Şenbabaoğlu Y, Riaz N, Sarungbam J, Tickoo SK, et al.

Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. *Elife* 2016;5. doi:10.7554/eLife.10769.

- [61] Yusoff AAM, Abdullah WSW, Khair SZNM, Radzak SMA. A comprehensive overview of mitochondrial DNA 4977-bp deletion in cancer studies. *Oncol Rev* 2019;13:54–64. doi:10.4081/oncol.2019.409.
- [62] Lee HC, Yin PH, Lin JC, Wu CC, Chen CY, Wu CW, et al. Mitochondrial genome instability and mtDNA depletion in human cancers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1042, New York Academy of Sciences; 2005, p. 109–22. doi:10.1196/annals.1338.011.
- [63] Meierhofer D, Mayr JA, Foetschl U, Berger A, Fink K, Schmeller N, et al. Decrease of mitochondrial DNA content and energy metabolism in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2004;25:1005–10. doi:10.1093/carcin/bgh104.
- [64] Dey R, Moraes CT. Lack of oxidative phosphorylation and low mitochondrial membrane potential decrease susceptibility to apoptosis and do not modulate the protective effect of Bcl-x(L) in osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 2000;275:7087–94. doi:10.1074/jbc.275.10.7087.
- [65] Liberti M V., Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci* 2016;41:211–8. doi:10.1016/j.tibs.2015.12.001.
- [66] Pakendorf B, Stoneking M. MITOCHONDRIAL DNA AND HUMAN EVOLUTION. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2005;6:165–83. doi:10.1146/annurev.genom.6.080604.162249.
- [67] Ingman M, Kaessmann H, Pääbo S, Gyllensten U. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* 2000;408:708–13. doi:10.1038/35047064.
- [68] Wallace DC, Brown MD, Lott MT. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 1999;238:211–30. doi:10.1016/s0378-1119(99)00295-4.
- [69] Fang H, Shen L, Chen T, He J, Ding Z, Wei J, et al. Cancer type-specific modulation of mitochondrial haplogroups in breast, colorectal and thyroid cancer. *BMC Cancer* 2010;10. doi:10.1186/1471-2407-10-421.
- [70] Ma L, Fu Q, Xu B, Zhou H, Gao J, Shao X, et al. Breast cancer-associated mitochondrial DNA haplogroup promotes neoplastic growth via ROS-mediated AKT activation. *Int J Cancer* 2017;00:1–11. doi:10.1002/ijc.31207.
- [71] Bai R-K, Leal SM, Covarrubias D, Liu A, Wong L-JC. Mitochondrial genetic background modifies breast cancer risk. *Cancer Res* 2007;67:4687–94. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3554.
- [72] Vigilant L, Pennington R, Harpending H, Kocher TD, Wilson AC. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African

population. *Proc Natl Acad Sci* 1989;86:9350–4.
doi:10.1073/pnas.86.23.9350.

- [73] Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 1999;23:147. doi:10.1038/13779.
- [74] Kumar S, Bellis C, Zlojutro M, Melton PE, Blangero J, Curran JE. Large scale mitochondrial sequencing in Mexican Americans suggests a reappraisal of Native American origins. *BMC Evol Biol* 2011;11:293. doi:10.1186/1471-2148-11-293.
- [75] Achilli A, Perego UA, Bravi CM, Coble MD, Kong Q, Scott R. The Phylogeny of the Four Pan-American MtDNA Haplogroups : Implications for Evolutionary and Disease Studies 2008;3. doi:10.1371/journal.pone.0001764.
- [76] Derenko M, Malyarchuk B, Grzybowski T, Denisova G, Rogalla U, Perkova M, et al. Origin and post-glacial dispersal of mitochondrial DNA haplogroups C and D in Northern Asia. *PLoS One* 2010;5:1–9. doi:10.1371/journal.pone.0015214.
- [77] Mizuno F, Gojobori J, Wang L, Onishi K, Sugiyama S, Granados J, et al. Complete mitogenome analysis of indigenous populations in Mexico: Its relevance for the origin of Mesoamericans. *J Hum Genet* 2014;59:359–67. doi:10.1038/jhg.2014.35.
- [78] Fan AX, Radpour R, Haghighi MM, Kohler C, Xia P, Hahn S, et al. Mitochondrial DNA content in paired normal and cancerous breast tissue samples from patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135:983–9. doi:10.1007/s00432-008-0533-9.
- [79] Marcel V, Khoury MP, Fernandes K, Diot A, Lane DP, Bourdon J-C. Detecting p53 Isoforms at Protein Level. *Methods Mol. Biol.*, vol. 962, 2013, p. 15–29. doi:10.1007/978-1-62703-236-0_2.
- [80] Domínguez-de-la-Cruz E, Muñoz ML, Pérez-Muñoz A, García-Hernández N, Moctezuma- Meza C, Hinojosa-Cruz JC. Expression of the $\Delta 40p53\alpha$ and $\Delta 133p53\alpha$ isoforms are associated with age, body mass index and receptor status in Mexican women with breast cancer. *Cancer Genet* 2020. En revisión.
- [81] Domínguez-de-la-Cruz E, Muñoz M de L, Pérez-Muñoz A, García-Hernández N, Moctezuma- Meza C, Hinojosa-Cruz JC. Reduced mitochondrial DNA copy number is associated with the haplogroup, and some clinical features of breast cancer in Mexican patients. *Gene* 2020;761:145047. doi:10.1016/j.gene.2020.145047.
- [82] Campbell H, Fleming N, Roth I, Mehta S, Wiles A, Williams G, et al. $\Delta 133p53$

isoform promotes tumour invasion and metastasis via interleukin-6 activation of JAK-STAT and RhoA-ROCK signaling. *Nat Commun* 2018;9. doi:10.1038/s41467-017-02408-0.

- [83] Vieler M, Sanyal S. p53 Isoforms and Their Implications in Cancer. *Cancers (Basel)* 2018;10:288. doi:10.3390/cancers10090288.
- [84] Kim S, An SSA. Role of p53 isoforms and aggregations in cancer. *Medicine (Baltimore)* 2016;95:e3993. doi:10.1097/MD.0000000000003993.
- [85] Navale AM, Paranjape AN. Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophys Rev* 2016;8:5–9. doi:10.1007/s12551-015-0186-2.
- [86] Zhu J, Zhou W, Jiang J, Chen X. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for mediating apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273:13030–6. doi:10.1074/jbc.273.21.13030.
- [87] Horikawa I, Park K, Isogaya K, Hiyoshi Y, Li H, Anami K, et al. Δ 133p53 represses p53-inducible senescence genes and enhances the generation of human induced pluripotent stem cells. *Cell Death Differ* 2017;24:1017–28. doi:10.1038/cdd.2017.48.
- [88] Sun S, Sun Y, Rong X, Bai L. High glucose promotes breast cancer proliferation and metastasis by impairing angiotensinogen expression. *Biosci Rep* 2019;39. doi:10.1042/BSR20190436.
- [89] Wei ML, Duan P, Wang ZM, Ding M, Tu P. High glucose and high insulin conditions promote MCF-7 cell proliferation and invasion by upregulating IRS1 and activating the Ras/Raf/ERK pathway. *Mol Med Rep* 2017;16:6690–6. doi:10.3892/mmr.2017.7420.
- [90] Jewett A, Yee-Chen Huang A, Alfaro C, Prado-Garcia H, Javier Sánchez-García F, Romero-Garcia S, et al. Lactate Contribution to the Tumor Microenvironment: Mechanisms, effects on immune Cells and Therapeutic Relevance 2016;7:1. doi:10.3389/fimmu.2016.00052.
- [91] Hunt TK, Aslam RS, Beckert S, Wagner S, Ghani QP, Hussain MZ, et al. Aerobically derived lactate stimulates revascularization and tissue repair via redox mechanisms. *Antioxidants Redox Signal* 2007;9:1115–24. doi:10.1089/ars.2007.1674.
- [92] Porporato PE, Payen VL, De Saedeleer CJ, Pr eat V, Thissen JP, Feron O, et al. Lactate stimulates angiogenesis and accelerates the healing of superficial and ischemic wounds in mice. *Angiogenesis* 2012;15:581–92. doi:10.1007/s10456-012-9282-0.
- [93] Calcinotto A, Filipazzi P, Grioni M, Iero M, De Milito A, Ricupito A, et al. Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor-infiltrating T lymphocytes. *Cancer Res* 2012;72:2746–56.

doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1272.

- [94] Mendler AN, Hu B, Prinz PU, Kreutz M, Gottfried E, Noessner E. Tumor lactic acidosis suppresses CTL function by inhibition of p38 and JNK/c-Jun activation. *Int J Cancer* 2012;131:633–40. doi:10.1002/ijc.26410.
- [95] Husain Z, Seth P, Sukhatme VP. Tumor-derived lactate and myeloid-derived suppressor cells: Linking metabolism to cancer immunology. *Oncoimmunology* 2013;2. doi:10.4161/onci.26383.
- [96] Yoneda T, Hiasa M, Nagata Y, Okui T, White FA. Acidic microenvironment and bone pain in cancer-colonized bone. *Bonekey Rep* 2015;4. doi:10.1038/bonekey.2015.58.
- [97] Subramanian A, Miller DM. Structural analysis of α -enolase: Mapping the functional domains involved in down-regulation of the c-myc protooncogene. *J Biol Chem* 2000;275:5958–65. doi:10.1074/jbc.275.8.5958.
- [98] Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, et al. Inhibition of glycolysis in cancer cells: A novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* 2005;65:613–21.
- [99] Capello M, Ferri-Borgogno S, Cappello P, Novelli F. α -enolase: A promising therapeutic and diagnostic tumor target. *FEBS J* 2011;278:1064–74. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08025.x.
- [100] Kolobova E, Tuganova A, Boulatnikov I, Popov KM. Regulation of pyruvate dehydrogenase activity through phosphorylation at multiple sites. *Biochem J* 2001;358:69–77. doi:10.1042/0264-6021:3580069.
- [101] Rao S, Mondragón L, Pranjić B, Hanada T, Stoll G, Köcher T, et al. AIF-regulated oxidative phosphorylation supports lung cancer development. *Cell Res* 2019;29:579–91. doi:10.1038/s41422-019-0181-4.
- [102] Vahsen N, Candé C, Brière JJ, Bénit P, Joza N, Larochette N, et al. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J* 2004;23:4679–89. doi:10.1038/sj.emboj.7600461.
- [103] Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, et al. Dna binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol* 2002;9:680–4. doi:10.1038/nsb836.
- [104] Cregan SP, Dawson VL, Slack RS. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 2004;23:2785–96. doi:10.1038/sj.onc.1207517.
- [105] Shen S, Guo M, Xiong Z, Yu Y, Zhao X, Zhang F, et al. AIF inhibits tumor metastasis by protecting PTEN from oxidation. *EMBO Rep* 2015;16:1563–80. doi:10.15252/embr.201540536.

- [106] McKinney K, Mattia M, Gottifredi V, Prives C. p53 linear diffusion along DNA requires its C terminus. *Mol Cell* 2004;16:413–24. doi:10.1016/j.molcel.2004.09.032.
- [107] Marcel V, Vijayakumar V, Fernández-Cuesta L, Hafsi H, Sagne C, Hautefeuille A, et al. p53 regulates the transcription of its $\Delta 133p53$ isoform through specific response elements contained within the TP53 P2 internal promoter. *Oncogene* 2010;29:2691–700. doi:10.1038/onc.2010.26.
- [108] Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: Understanding tumorigenic mutations. *Science* (80-) 1994;265:346–55. doi:10.1126/science.8023157.
- [109] Yu M. Generation, function and diagnostic value of mitochondrial DNA copy number alterations in human cancers. *Life Sci* 2011;89:65–71. doi:10.1016/j.lfs.2011.05.010.
- [110] Zhang Q, Liang Z, Gao Y, Teng M, Niu L. Differentially expressed mitochondrial genes in breast cancer cells: Potential new targets for anti-cancer therapies. *Gene* 2017;596:45–52. doi:10.1016/j.gene.2016.10.005.
- [111] Tomiyama A, Serizawa S, Tachibana K, Sakurada K, Samejima H, Kuchino Y, et al. Critical role for mitochondrial oxidative phosphorylation in the activation of tumor suppressors Bax and Bak. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1462–73. doi:10.1093/jnci/djj395.
- [112] Park J-Y, Wang P, Matsumoto T, Sung HJ, Ma W, Choi JW, et al. p53 Improves Aerobic Exercise Capacity and Augments Skeletal Muscle Mitochondrial DNA Content. *Circ Res* 2009;105:705–12. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.205310.
- [113] Chakrabarty S, D’Souza RR, Kabekkodu SP, Gopinath PM, Rossignol R, Satyamoorthy K. Upregulation of TFAM and mitochondria copy number in human lymphoblastoid cells. *Mitochondrion* 2014;15:52–8. doi:10.1016/j.mito.2014.01.002.

XII. ANEXO

12.1 Expression of the $\Delta 40p53\alpha$ and $\Delta 133p53\alpha$ isoforms are associated with age, body mass index and receptor status in Mexican women with breast cancer

En revisión

Cancer Genetics-Journal Manuscript Details

Manuscript Details

Manuscript number	CG_2019_379
Title	Expression of the $\Delta 40p53\alpha$ and $\Delta 133p53\alpha$ isoforms are associated with age, body mass index and receptor status in Mexican women with breast cancer
Article type	Original article

Abstract

There are extensive studies on the tumor suppressor P53 gene in human cancer, including breast cancer. The clinical features of breast cancer are associated with P53 mutations and, recently, have been shown to be associated with the expression of smaller isoforms of P53. Here, we studied the $\Delta 40p53\alpha$, $\Delta 133p53\alpha$ and p53 β/γ isoform proteins expressed in breast cancer tissue (BCT) and in matched normal adjacent tissue (NAT) in a Mexican population of women. The expression of p53 isoform proteins was evaluated in 92 BCT and in matched NAT by immunoblot, and their association was correlated with clinical features. The results showed that the protein expression of $\Delta 40p53\alpha$ significantly decreased in BCT compared to NAT and that of $\Delta 133p53\alpha$ significantly increased in BCT compared to NAT. The expression of $\Delta 40p53\alpha$ was positively associated with age, and that of $\Delta 133p53\alpha$ was positively associated with body mass index (BMI). Additionally, $\Delta 133p53\alpha$ was expressed at a higher frequency in BCT women over 50 years old, obese patients or those who were estrogen receptor (ER)-positive. In conclusion, the results of this study showed that the $\Delta 40p53\alpha$ and $\Delta 133p53\alpha$ isoforms are differentially expressed in BCT and NAT and are directly dependent on patient clinical characteristics.

Keywords	p53 isoforms; Breast cancer; Mexican women; Clinical features.
Taxonomy	Protein P53, Medical Science, Breast Cancer Subtyping, Specimen
Manuscript category	Clinical cancer molecular genetics and genomics
Corresponding Author	MARIA DE LOURDES Munoz
Corresponding Author's Institution	Centro de Investigacion y de Estudios Avanzados del IPN
Order of Authors	Eduardo Domínguez-de-la-Cruz, MARIA DE LOURDES Munoz, Ashael Perez, Normand García-Hernández, Christian Moctezuma- Meza, Juan Carlos Hinojosa-Cruz
Suggested reviewers	Robert Zeillinger, Bjørn Gjertsen, Linda Boldrup

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover Letter 08_28_2019.docx [Cover Letter]

Highlights.docx [Highlights]

E42CB8FB Manuscript Dominguez-et-al-07_25_2019-REV ED (1).docx [Manuscript File]

Figure1.jpg [Figure]

Figure2.jpg [Figure]

Conflict of Interest.pdf [Conflict of Interest]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

12.2 Reduced mitochondrial DNA copy number is associated with the haplogroup, and some clinical features of breast cancer in Mexican patients

Gene 761 (2020) 145047



Contents lists available at ScienceDirect

Gene

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene



Research paper

Reduced mitochondrial DNA copy number is associated with the haplogroup, and some clinical features of breast cancer in Mexican patients



Eduardo Domínguez-de-la-Cruz^a, María de Lourdes Muñoz^{a,*}, Ashael Pérez-Muñoz^a,
Normand García-Hernández^b, Christian Moctezuma-Meza^c, Juan Carlos Hinojosa-Cruz^c

^a Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

^b Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Centro Médico Nacional (CMN) Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City, Mexico

^c Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 3 "Dr. Victor Manuel Espinosa de los Reyes Sánchez, Centro Médico Nacional La Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

mtDNA copy number
Amerindian haplogroup
Clinical features
Polymorphisms

ABSTRACT

Mitochondrial DNA (mtDNA) copy number and mitochondrial DNA haplogroups have been associated with different types of cancer, including breast cancer, because they alter cellular energy metabolism. However, whether mtDNA copy number or haplogroups are predictors of oxidative stress-related risks in human breast cancer tissue in Mexican patients remains to be determined. Using quantitative real-time PCR assays and sequencing of the mtDNA hypervariable region, analysis of mtDNA copy numbers in 82 breast cancer tissues (BCT) and matched normal adjacent tissues (NAT) was performed to determine if copy number correlated with clinical features and Amerindian haplogroups (A2, B2, B4, C1 and D1). The results showed that the mtDNA copy number was significantly decreased in BCT compared with NAT ($p = 0.010$); it was significantly decreased in BCT and NAT in women > 50 years of age, compared with NAT in women < 50 years of age ($p = 0.032$ and $p = 0.037$, respectively); it was significantly decreased in NAT and BCT in the postmenopausal group and in BCT in the premenopausal group compared with NAT in the premenopausal group ($p = 0.011$, $p = 0.010$ and $p = 0.018$; respectively); and it was also significantly decrease in members of the BCT group classified as having invasive ductal carcinoma I-III (IDC-I, IDC-II and IDC-III) and IDC-II for NAT compared to IDC-I of NAT ($p = 0.025$, $p = 0.022$ and $p = 0.031$ and $p = 0.020$; respectively). The mtDNA copy number for BCT from patients with haplogroup B2 was decreased compared to patients with haplogroup D1 ($p = 0.01$); for BCT from patients with haplogroup C1 was also decreased compare with their NAT counterpart ($p = 0.006$) and with BCT patients belonging to haplogroups A2 and D1 ($p = 0.01$ and $p = 0.03$; respectively). In addition, the mtDNA copy number was decrease in the sequences with three deletions relative to the rCRS at nucleotide positions A249del, A290del and A291del, or C16327T polymorphism with the same $p = 0.019$ for all four variants. Contrary, the copy number increased in sequences containing C16111T, G16319A or T16362C polymorphisms ($p = 0.021$, $p = 0.048$, and $p = 0.001$; respectively). In conclusion, a decrease in the copy number of mtDNA in BCT compared with NAT was shown by the results, which suggests an imbalance in oxidative phosphorylation (OXPHOS) that can affect the apoptosis pathway and cancer progression. It was also observed an increase of the copy number in samples with specific polymorphisms, which may be a good sign of favourable prognosis.

1. Introduction

Mitochondria play an essential role in bioenergetics and

biosynthetic pathways for normal cell function and human health (Burke, 2017). In contrast to nuclear DNA, mitochondrial DNA (mtDNA) is more susceptible to damage due to the absence of protective

Abbreviations: BCT, breast cancer tissue; NAT, normal adjacent tissue; BMI, body mass index; CT, threshold cycle number; ER, oestrogen receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor-type 2; IDC, invasive ductal carcinoma; ILC, invasive lobular carcinoma; mtDNA, mitochondrial DNA; OXPHOS, oxidative phosphorylation; PR, progesterone receptor; ROS, reactive oxygen species; Rs, Spearman's rank correlation coefficient; SEM, standard error of the mean; TNBC, triple-negative breast cancers

* Corresponding author at: Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, Gustavo A. Madero 07360 Mexico City, Mexico.

E-mail address: lmunoz@cinvestav.mx (M.d.L. Muñoz).

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145047>

Received 17 March 2020; Received in revised form 18 July 2020; Accepted 6 August 2020

Available online 09 August 2020

0378-1119/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

histones, limited DNA repair capability, absence of introns and continuous exposure to reactive oxygen species (ROS), resulting in an imbalance in oxidative phosphorylation (OXPHOS) activity (Chandra and Singh, 2011; Song et al., 2005; Szczepanowska and Trifunovic, 2015).

In different types of cancers, glycolysis is upregulated relative to that of normal cells, while oxidative phosphorylation (OXPHOS) is downregulated, causing an antiapoptotic effect (Dey and Moraes, 2000; Liberti and Locasale, 2016). Furthermore, efficient OXPHOS activity significantly influences Bax and Bak activation and cell death in cancer cells (Tomiyama et al., 2006). Hence, it has been suggested that downregulation of OXPHOS is a means by which cancer cells protect themselves from programmed cell death and sustain cancer progression (Sánchez-Aragó et al., 2010); further, such downregulation is associated with a poor clinical outcome across different types of cancers, including breast cancer (Gaude and Frezza, 2016).

Breast cancer is the most frequently diagnosed cancer in women (11.6%) globally, and the incidence and mortality rates for this disease have increased in developing countries (Bray et al., 2018). In Mexico, breast cancer is the main cause of mortality in economically productive women (20 years of age and older), with a rate of 16 deaths per 100,000 women (INFOCANCER, 2019). Development and progression of breast cancer has been associated with multifactorial factors such as age, eating unhealthy food, lower age of menarche, obesity after menopause, use of hormone replacement therapy, physical inactivity, alcohol consumption, cigarette smoking, and nuclear and mitochondrial genetic alterations (Caudron-Herger and Diederichs, 2018; Colditz and Bohlke, 2014; Skol et al., 2016).

Mutations and polymorphisms in mtDNA have been reported to be associated with different types of cancers. In addition, alterations in mtDNA content also have been reported in a broad range of human cancers, suggesting their influence in cancer development and progression (Yu, 2011). For instance, increases in mtDNA copy numbers have been identified in endometrial adenocarcinoma cells (Wang et al., 2005), oesophageal squamous cell carcinoma (Lin et al., 2012) and pancreatic cancer (Lynch et al., 2011). In contrast, decreased mtDNA copy numbers have also been identified in lung cancer (Lee et al., 2005; Lin et al., 2008), renal cell carcinoma (Meierhofer et al., 2004), colorectal cancer (Huang et al., 2014), gastric cancer (Sun et al., 2014), hepatocellular carcinoma (Yin et al., 2004) and breast cancer (Bai et al., 2011; Fan et al., 2009; Yu et al., 2007).

In addition, haplogroups associated with a risk of different kinds of cancers have also been reported, such as haplogroup U with prostate and renal cancer in American Caucasian patients (Booker et al., 2006), haplogroups M and D5 with breast cancer in Chinese populations (Fang et al., 2010; Ma et al., 2017), and haplogroup K with breast cancer in a European-American population (Bai et al., 2007); Bai et al. (2007) also reported that haplogroup U is associated with cancer protection. Additionally, it has been shown that the mtDNA content varies according to the mitochondrial haplogroups in end-stage renal disease (Zhang et al., 2017a) and in breast cancer (Ma et al., 2017). The mechanisms by which haplogroups are involved in the development of cancer are still unknown; however, it has been observed that in cybrids of breast cancer, the haplogroup D5 exhibits a decrease in mtDNA content and promotes tumorigenesis through over-activation of AKT that is mediated by increased ROS, and a reduced mitochondrial OXPHOS function caused by lower complex I and III activities (Ma et al., 2017).

To the best of our knowledge, there are no studies that evaluate copy numbers in breast cancer tissue and paired normal adjacent tissue in Mexican women while taking into account their mitochondrial haplogroups and clinical features. Thus, in this report, the changes in the relative mtDNA copy numbers in breast cancer tissues and matched normal adjacent tissues from 82 Mexican women were evaluated. In addition, the relationship between the mtDNA copy number with clinical features, and mitochondrial Amerindian haplogroups were also assessed.

Table 1
Correlation between mtDNA copy number in BCT and clinical features.

Clinical feature	BCT		NAT		BCT/NAT ratio	
	r_s	p-value	r_s	p-value	r_s	p-value*
Histological subtypes	- 0.141	0.047	0.185	0.097	0.043	0.703
ER	0.086	0.442	- 0.018	0.875	0.044	0.692
PR	- 0.001	0.996	- 0.057	0.609	- 0.070	0.530
HER2	0.081	0.468	0.098	0.381	0.141	0.206
TNBC	0.086	0.442	- 0.018	0.875	0.044	0.692
Age	- 0.134	0.232	- 0.304	0.005	- 0.285	0.009
Menopause	0.026	0.817	- 0.286	0.009	- 0.205	0.064
BMI	- 0.057	0.610	- 0.004	0.971	- 0.050	0.659
Smoke	0.186	0.095	0.142	0.204	0.128	0.251
Alcohol	- 0.012	0.916	- 0.016	0.886	- 0.073	0.513

Statistical analysis was performed using a Spearman's rank correlation test. P-values < 0.05 are in bold, indicating significance. MtDNA, mitochondrial DNA; r_s Spearman's rank correlation coefficient. NAT, normal adjacent tissue; BCT, breast cancer tissue; ER, oestrogen receptor; PR, progesterone receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; and TNBC, triple-negative breast cancer.

2. Material and methods

2.1. Collection of tissue samples from breast cancer patients

Frozen breast cancer tissues and matched normal adjacent tissues from 82 Mexican women were obtained from the Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Ginecobstetricia number 3, Centro Médico Nacional La Raza from the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) and were registered with project numbers 2015-785-016 and 2017-785-071. The normal adjacent tissues were assessed by a pathologist. The histological subtype, receptor status, age, body mass index (BMI), menopausal status, and alcohol and cigarette consumption data are described in Supplementary Table 1. None of the patients had a previous history of cancer, surgery, chemotherapy, radiotherapy, or other treatments for breast cancer prior to tissue extraction. This study was approved by the Ethics Committee of the National Ethics Commission from the IMSS. The tests were conducted following the rules established in the Helsinki agreement. All patients were duly informed and consented to their tissue and clinical information being used in this study.

2.2. Clinical features of patients

The 82 subjects included in this study were women with an average age of 56.5 (\pm 10.64) years and an average BMI of 29.47 (4.82). The histological subtypes were classified depending on cell type, amount, type and location of secretion, architectural features and immunohistochemical profile. Thus, 54% of the samples were invasive ductal carcinoma I (IDC-I), 10% were invasive ductal carcinoma II (IDC-II), 19% were invasive ductal carcinoma III (IDC-III) and 17% were invasive lobular carcinoma I (ILC-I). Regarding the expression of hormone receptors, 84, 78 and 5% were positive for oestrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor-type 2 (HER2), respectively, and 16% were triple-negative breast cancers (TNBC). Regarding the menopause status, 18% were classified as premenopausal and 82% as postmenopausal. Further, 12% were smoked cigarettes and 6% consumed alcohol (Supplementary Table 1).

2.3. DNA extraction

Genomic DNA was obtained from 40 mg of BCT and NAT. Each tissue was placed in a 1.5 ml microtube containing 15 μ l of cell lysis buffer from a Puregene® Blood Core C kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)

and 15 µl of proteinase K, and then the samples were kept at 56 °C overnight according to the manufacturer's instructions.

2.4. PCR amplification and sequence analysis

The D-loop region of mtDNA was amplified using the following primer pair: forward L15996 (5'-CTCCACCATAGCACCCAAAGC-3') and reverse H408 (5'-CTGTAAAAGTCATACCGCCA-3') as previously described (Vigilant et al., 1989). PCR was performed according to the High-Fidelity Polymerase protocol (Jena Bioscience GmbH, Jena, Germany). The PCR conditions were as follow: initial denaturing at 95 °C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 50 s, annealing at 59 °C for 50 s, strand elongation at 68 °C for 1 min, and a final extension at 68 °C for 3 min. All of the amplified products were purified using an SAP-Exo kit (Jena Bioscience GmbH, Jena, Germany) and then were sequenced with the same PCR primer sets using a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and an ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer (PE Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

Sequence variants were scored relative to the Cambridge reference sequence (rCRS) (Andrews et al., 1999). The mtDNA haplogroups were classified according to the previously reported nomenclature (Achilli et al., 2008; Derenko et al., 2010; Kumar et al., 2011; Mizuno et al., 2014) and then were compared using the Mitomaster bioinformatics tool (<https://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMASTER/WebHome>). All sequences were deposited in the NCBI database (Benson et al., 2018) under GenBank accession numbers: MT199423 – MT199426, MT199428 – MT199451, MT199453, MT199456, MT199459 – MT199470, MT199472 – MT199473, MT199475 – MT199478, MT199480 – MT199493, MT199495 – MT199498, MT199501 – MT199502, MT199505 – MT199507, and MT199509 (Supplementary Table 2).

2.5. Quantification of relative mtDNA copy number

The ratio of mtDNA to nuclear DNA was used to determine the relative copy number of mtDNA. Real-Time PCR assays were performed on a Step One Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific) using SYBR® Green qPCR Mastermix (Applied Biosystems, Warrington, UK). Real time PCR was performed in duplicate for each mitochondrial and nuclear primer: human mtDNA (human tRNA leucine 1 + transcription terminator + 5S-like sequence), and human nuclear DNA (18S ribosomal DNA) was assessed as previously described (Ma et al., 2017). The cycling reaction conditions were: a "Hot Start" activation step for 5 min at 94 °C followed by 40 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 60 °C, then 30 s at 72 °C. The average threshold cycle number (Ct) values for the mtDNA

and nDNA were obtained from each case. The mtDNA content was calculated using the delta Ct (ΔCt) of overage of Ct of mtDNA and nDNA ($\Delta Ct = Ct\ nDNA - Ct\ mtDNA$) from the same well as an exponent of 2 ($2^{-\Delta Ct}$) as previously reported (Fan et al., 2009). The copy number ratio (BCT/NAT) of mtDNA content was also calculated to determine the ratio of the mtDNA content in tumour tissue to the mtDNA content in the surrounding normal adjacent tissue from the same patient. The efficiencies of the primers were quantitatively determined to be between 95% and 110%.

2.6. Statistical analysis

The distribution of the data was assessed using a Kolmogorov-Smirnov test. The variables did not follow a normal distribution; thus, the data were compared using nonparametric tests. The differences of the means between the relative mtDNA copy numbers and clinical features or haplogroups were determined using the Mann-Whitney *U* test to compare two groups, and the Kruskal-Wallis rank sum test to compare three or more groups. When we detected significant differences in the means of mtDNA content in the clinical features subgroups from the previous test, we utilized a post hoc test to determine which means were different. The relationships between the relative mtDNA copy number and variables were evaluated using the Spearman's rank correlation test. All statistical tests were two sided, and *P* values < 0.05 were considered statistically significant. All analyses were performed using GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software, La Jolla, CA) and IBM SPSS Statistics 23 software (IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

3. Results

3.1. Mitochondrial DNA content in BCT and NAT

To determine if there was a difference in mtDNA content of BCT compared with NAT, the relative mtDNA copy number was measured using the delta Ct method. The BCT/NAT ratio of mtDNA content indicated the ratio of the mtDNA content in breast cancer tissue to the mtDNA content in the normal adjacent tissue from the same patient; where a BCT/NAT ratio > 1 indicates an increase of mtDNA content, and a BCT/NAT ratio < 1 indicates a decrease of mtDNA content. Fig. 1A shows that the mean mtDNA content in BCT was significantly decreased compared with that of NAT (*p* = 0.01). The values obtained for the BCT/NAT ratio indicate that approximately 62% (51/82) of the samples had diminished mtDNA content (BCT/NAT ratio < 1), while 48% (31/82) had increased mtDNA content (BCT/NAT ratio > 1; Supplementary Table 1).

3.2. The mtDNA content decreases depending on the histological subtypes

The differences in the means of mtDNA copy number in BCT and NAT with regard to selected clinical features were evaluated using nonparametric tests. As presented in Supplementary Table 1, no significant differences were identified in mtDNA content with regard to BMI, ER, PR, HER2, TNBC, or with cigarette smoking or alcohol consumption.

In relation to histological subtypes, the results indicate that the mtDNA content decreased significantly in IDC-I, IDC-II and IDC-III of BCT, and in IDC-II of NAT when compared with IDC-I of the NAT group (*p* = 0.025, *p* = 0.022, *p* = 0.031 and, *p* = 0.020; respectively). In ILC-I of BCT, a tendency to decrease was observed, but a significant difference was not detected, as shown in Fig. 1B and the Supplementary Table 1. The BCT/NAT ratio calculated in each breast cancer tissue and matched normal adjacent tissues samples of IDC-I, IDC-III and ILC-I was < 1, indicating a general decrease in the copy number, while in IDC-II, an increase in the copy number was detected (BCT/NAT ratio > 1). Nevertheless, when the BCT/NAT ratio was compared

Table 2
Comparison of mtDNA copy number in BCT and NAT in relation to Amerindian haplogroups.

mtDNA copy number in BCT and NAT				
Haplogroup (N/%)	BCT (SEM)	NAT (SEM)	p-value ^b	BCT/NAT ratio
A2 (30/41.7)	3.59 (0.85)	3.22 (0.67)	0.573*	1.11 (0.89)
B2 (14/19.5)	1.79 (0.62)	5.59 (1.77)	0.123*	0.40 (0.41)
B4 (9/12.5)	2.36 (0.86)	3.91 (2.18)	0.863*	0.60 (0.53)
C1 (13/18.0)	1.31 (0.36)	5.78 (2.17)	0.006*	0.24 (0.19)
D1 (6/8.3)	6.30 (2.38)	10.66 (3.71)	0.588*	0.59 (0.38)
p-value ^a	0.011**	0.190**		0.062**

Statistical significance was evaluated using Mann-Whitney *U*⁺ or Kruskal-Wallis⁺⁺ tests (*p*-value < 0.05); ^a*p*-value, shows differences of mtDNA copy number between Amerindian haplogroup (A2, B2, B4, C1 and D1; columns); ^b*p*-value, shows differences of mtDNA copy number between BCT and NAT of each haplogroup (rows); SEM, standard error of the mean. Statistically significant *p*-values < 0.05 are in bold; mtDNA, mitochondrial DNA; NAT, normal adjacent tissue; BCT, breast cancer tissue.

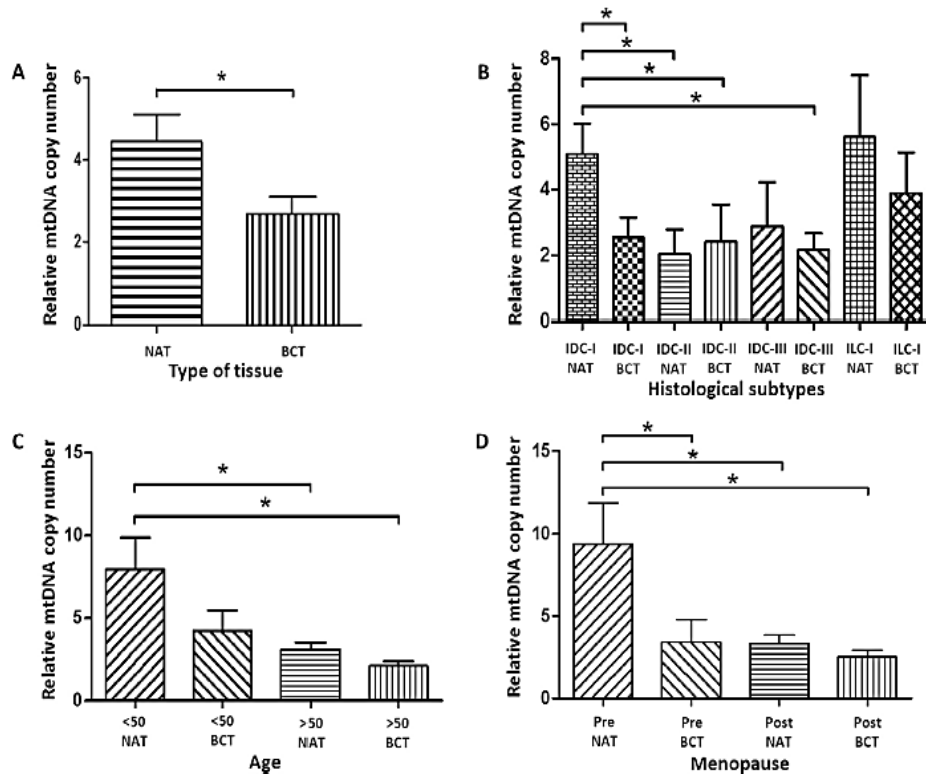


Fig. 1. Comparison of mtDNA content of breast cancer tissue. Mitochondrial DNA content was evaluated in samples of: A) BCT compared with NAT; B) BCT and NAT in IDC-I - IDC-III stages compared with IDC-I in the NAT group; C) BCT and NAT of women > 50 years of age compared with < 50 years of age in the NAT group; and D) BCT and NAT groups of postmenopausal and premenopausal women compared with a premenopausal NAT group. *Statistical analysis using the Kruskal-Wallis rank sum test showing a significant $p < 0.05$.

between each subtype, no significant differences were detected (Supplementary Table 1).

3.3. The mtDNA content varies depending on age and menopausal status

The results also indicate that the mtDNA content is significantly decreased in BCT and NAT in women > 50 years of age compared with NAT in women < 50 years of age ($p = 0.032$ and $p = 0.037$, respectively) (Fig. 1C and Supplementary Table 1). A general decrease (BCT/NAT ratio < 1) was observed in both the < 50 and > 50 years of age groups without significant differences.

In postmenopausal patients, the mtDNA content was significantly diminished in the BCT and NAT groups, as well as in the premenopausal BCT group when compared with premenopausal patients in the NAT group. The BCT/NAT ratio was < 1 in both pre- and postmenopausal groups with a significant difference ($p = 0.043$), indicating a general decrease. The data are shown in Fig. 1D and Supplementary Table 1.

3.4. Relationship between mtDNA copy number and clinical features in breast cancer patients

To determine the relationships between mtDNA content and different clinical features, the variables under study were evaluated using the Spearman's rank correlation test. It was considered directly proportional when the correlation coefficient (r_s) was positive, and inversely proportional when the r_s was negative. The data in Table 1

indicate that there is no correlation between mtDNA copy number and BMI, ER, PR, HER2, TNBC, menopause, and cigarette smoking or alcohol consumption. In contrast, we found a negative correlation between mtDNA content and histological subtypes in BCT ($r_s = -0.141$; $p = 0.047$), age in the NAT group ($r_s = -0.304$; $p = 0.005$), and menopausal status in NAT ($r_s = -0.286$; $p = 0.009$). A significant negative correlation was also found with the BCT/NAT ratio for age ($r_s = -0.285$; $p = 0.009$).

3.5. Relationship of mtDNA copy number to Amerindian mtDNA haplogroups

To assess the haplogroups of breast cancer patients, the sequences of the mtDNA D-loop region were analysed, and subsequently the means of mtDNA content were compared between each Amerindian haplogroup in both BCT and NAT. Although non-Amerindian mtDNA haplogroups were identified in approximately 5% of the samples, they were not included because our study focused on Native Mexicans. Therefore, this analysis included 72 breast cancer patients with haplogroups A2 (41.7%), B2 (19.5%), B4 (12.5%), C1 (18.0%) and D1 (8.3%) as shown in Table 2.

The Kruskal-Wallis test showed significant differences in mtDNA content means between haplogroups of the BCT group ($p = 0.011$) but not between haplogroups of NAT group ($p = 0.190$) (Table 2). Because we found significant differences in mtDNA content between subgroups of BCT, we performed post hoc tests to determine which mean were

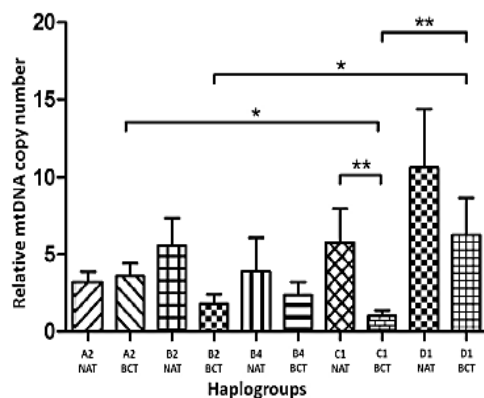


Fig. 2. Comparison of mtDNA content according to Amerindian haplogroups A2, B2, B4, C1 and D1. The mtDNA content was evaluated in BCT compared with NAT in patients belonging to haplogroups A2, B2, B4, C1 and D1. *Statistical analysis using a Kruskal-Wallis rank sum test displaying a significant $p < 0.05$.

different between all subgroups of BCT and NAT. The mtDNA copy number for BCT from patients with haplogroup B2 was decreased compared to patients with haplogroup D1 ($p = 0.01$); a significant decrease in mtDNA content in BCT compared with that of NAT in patients belonging to haplogroup C1 ($p = 0.006$) was also observed as shown on Fig. 2 and Table 2. Furthermore, a significant decrease in mtDNA content was also observed in BCT from patients belonging to haplogroup C1 compared to BCT from patients belonging to haplogroup A2 and D1 ($p = 0.01$ and $= 0.03$, respectively) (Fig. 2). The BCT/NAT ratio exhibited a general decrease ($BCT/NAT < 1$) of mtDNA content in the tissue samples from patients belonging to haplogroups B2, B4, C1 and D1; however, the mtDNA content of tissue from patients belonging to haplogroup A2 was increased ($BCT/NAT > 1$), but no significant differences were found (Table 2).

Finally, the mtDNA content of the BCT samples grouped by the specific polymorphisms found in the D-loop region was evaluated (Table 3 and Supplementary Table 2). Only the polymorphisms found in $> 5\%$ of the samples were considered in this analysis and the mtDNA content were compared with samples, which do not contain each specific polymorphism. Table 3 displays the evaluation of twenty three polymorphisms using this criterion.

A significant decrease in the mtDNA content was observed in the samples containing the A249del ($p = 0.019$), A290del, A291del ($p = 0.019$), and C16327T ($p = 0.019$) polymorphisms compared to samples without any of these polymorphisms. All these polymorphisms were contained in all patient samples belonging to haplogroup C1.

In addition, a significant increase in mtDNA content was observed in the samples containing the C16111T ($p = 0.021$), G16319A ($p = 0.048$), and T16362C ($p = 0.001$) polymorphisms compared with samples lacking the specific polymorphism. The percentage of each polymorphism is displayed in Supplementary Table 3. Most of these polymorphisms belonged to haplogroup A2, and T16362C polymorphism was identified in different proportions from patient samples belonging to haplogroups B2, C1, and D1 (Table 3 and Supplementary Tables 2).

4. Discussion

In recent years, mtDNA mutations, deletions, copy number and haplogroups have been associated with several types of cancer (Fliss et al., 2000; Luchini et al., 2018; Reznik et al., 2016; Yusoff et al., 2019). Here, we reported that there is a significant decrease in the

mtDNA content in BCT compared with NAT from 82 Mexican women. These results are consistent with previous reports that indicate that mtDNA copy number decreases in tumour tissues in lung cancer (Lee et al., 2005; Lin et al., 2008), renal cell carcinoma (Meierhofer et al., 2004), gastric cancer (Sun et al., 2014), hepatocellular carcinoma (Yin et al., 2004) and breast cancer (Bai et al., 2011; Yu et al., 2007). Some studies have suggested to the contrary that there is an increase in mtDNA content in oesophageal squamous cell carcinoma (Lin et al., 2012), prostate cancer (Zhou et al., 2014), pancreatic cancer (Lynch et al., 2011) and ovarian cancer (Keserü et al., 2019). An explanation for these discrepancies may be attributed to the sample size, type of tissues, patient ethnicity, differential clinical features, or family history.

Comparisons in cancer tissues and normal adjacent tissues have shown that in most non-cancerous cells the mtDNA copy number is high, while cancer cells show a decrease in mtDNA content (Reznik et al., 2016). A causal mechanism behind decreased mtDNA copy number in cancer cells may be related to D-loop mutations, since this region mediates mtDNA transcription and replication; mutations result in reduced mitochondrial gene expression and changes in protein synthesis, which contribute to OXPHOS dysfunction in cancer cells (Lee et al., 2005; Meierhofer et al., 2004; Yu, 2011; Zhang et al., 2017b). It has also been reported that a lack of functional OXPHOS is associated with an antiapoptotic effect in a human osteosarcoma-derived cell line, whereas an efficient OXPHOS activity significantly influences Bax and Bak activation and cell death in MCF-7 and HepG2 cell lines. Therefore, it has been suggested that an imbalance in OXPHOS activity contributes to the development of cancer (Dey and Moraes, 2000; Liberti and Locasale, 2016; Tomiyama et al., 2006), in addition to being associated with poor clinical outcome, which correlates with invasive and metastatic tumours in different solid cancer types (Gaude and Frezza, 2016).

Epigenetic mechanisms have also been proposed as regulators of the mtDNA copy number in carcinogenesis. For example, it has been observed that demethylation in specific sites on a CpG island of the D-loop promoter increases the mtDNA copy number, resulting in an increase in cell proliferation, reduced apoptosis, and induced cell-cycle arrest in the G0/G1 phase in cell cultures of colorectal cancer (Tong et al., 2017), whereas decreased methylation in an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's is associated with a decrease in mtDNA content as well as mitochondrial gene expression (Xu et al., 2019).

In this study, only tissue samples of patients classified as histological subtypes IDC-I - III and ILC-I were analysed. The histological subtypes IDC (70–80%) and ILC (10–15%) are more common types in breast cancer (Makki, 2015). Different studies indicate that patients with ILC may have a lower response to neoadjuvant chemotherapy and tamoxifen than those with IDC (Barroso-Sousa and Metzger-Filho, 2016; Filho et al., 2015). We detected a significant decrease in the mtDNA copy number in BCT samples diagnosed with IDC I-III and in IDC-II of NAT compared with IDC-I in the NAT group. In another study, a decrease in mtDNA content was reported in invasive breast cancer grade III of breast tumours compared with adjacent tissue (Yu et al., 2007). All of these results suggest that mtDNA content is important in cancer progression, probably by impairing OXPHOS (Gaude and Frezza, 2016; Mei et al., 2015).

Our results also displayed a significant decrease in mtDNA content in patients over 50 years of age compared with those under 50 in the NAT group. These results confirm previous studies in breast cancer that demonstrated a decrease of mtDNA content in breast cancer tissue in women > 50 years of age (Yu et al., 2007). It also has also been reported that the mtDNA copy number is decreased in peripheral blood samples of healthy men and women > 50 years of age compared with those < 50 years of age (Wachsmuth et al., 2016; Xia et al., 2017; Zhang et al., 2017c). These data suggest a correlation between age and mtDNA content.

The postmenopausal women that participated in this study were over 45 years of age, which is similar to the women's group classified by age; accordingly, this group also exhibited a reduced content of mtDNA

Table 3
Mitochondrial DNA Copy Number relative to specific polymorphisms in BCT patients.

mtDNA copy number of BCT samples with specific polymorphisms			
Polymorphism position (N/%)	Specific polymorphismMean (SEM)	Non-specific polymorphismMean (SEM)	p-value ^b
C64T (20/27.7)	3.02 (0.74)	2.78 (0.58)	0.293 ⁺
C114G (6/8.3)	2.30 (1.16)	2.90 (0.49)	0.951 ⁺
T146C (27/37.5)	3.74 (0.93)	2.31 (0.47)	0.220 ⁺
T152C (6/8.3)	3.26 (1.11)	2.81 (0.49)	0.420 ⁺
A153G (28/38.8)	3.56 (0.91)	2.39 (0.48)	0.205 ⁺
A235G (28/38.8)	3.64 (0.90)	2.34 (0.48)	0.123 ⁺
A249del (13/18)	1.01 (0.36)	3.25 (0.54)	0.019⁺
A290del (13/18)	1.01 (0.36)	3.25 (0.54)	0.019⁺
A291del (13/18)	1.01 (0.36)	3.25 (0.54)	0.019⁺
C309CC (47/65.2)	3.16 (0.63)	2.30 (0.60)	0.709 ⁺
C16111T (22/30.5)	4.30 (1.11)	2.20 (0.43)	0.021⁺
G16129A (5/6.9)	2.10 (0.52)	2.90 (0.49)	0.859 ⁺
T16136C (5/6.9)	6.51 (4.19)	2.57 (0.39)	0.478 ⁺
T16189C (23/31.9)	2.02 (0.50)	3.23 (0.63)	0.185 ⁺
T16217C (18/25)	2.03 (0.50)	3.12 (0.59)	0.442 ⁺
C16223T (47/65.2)	3.27 (0.66)	2.05 (0.48)	0.212 ⁺
C16290T (28/38.8)	3.72 (0.90)	2.29 (0.48)	0.067 ⁺
T16298C (11/38.8)	1.10 (0.42)	3.16 (0.53)	0.065 ⁺
G16319A (29/40.7)	3.70 (0.87)	2.27 (0.49)	0.048⁺
T16325C (20/27.7)	2.61 (0.90)	2.94 (0.54)	0.554 ⁺
C16327T (13/18)	1.01 (0.36)	3.25 (0.54)	0.019⁺
T16362C (35/48.6)	4.15 (0.83)	1.61 (0.34)	0.001⁺
T16519C (24/33.3)	2.76 (0.80)	2.89 (0.57)	0.534 ⁺
p-value ^a	0.035 ⁺⁺	0.711 ⁺⁺	

Statistical significance was evaluated using Mann-Whitney U⁺ or Kruskal-Wallis⁺⁺ tests (p-value < 0.05); ^ap-value, shows differences of mtDNA copy number between specific or non-specific polymorphisms (columns); ^bp-value, shows differences of mtDNA copy number between specific and non-specific polymorphisms (rows); SEM, standard error of the mean. Statistically significant p-values < 0.05 are in bold; mtDNA, mitochondrial DNA; NAT, normal adjacent tissue; BCT, breast cancer tissue.

copy number. To the contrary, mtDNA content increased in the peripheral blood of women with breast cancer compared with healthy women in a Chinese population (Jiang et al., 2014). The discrepancy may be due to tissue specificity, or ethnicity. Furthermore, post-menopausal women that exercise regularly have increased mtDNA content compared to that of women who do not exercise, which suggests a better quality of life for those who exercise (Chang et al., 2016).

It is known that mtDNA evolution has resulted in the distribution of sequences into continent-specific haplogroups, and it has been suggested that haplogroup-associated polymorphisms act as risk factors in various diseases, including cancer (Dong et al., 2018; Herrstadt and Howell, 2004) and that the mtDNA content may vary depending on the haplogroup (Ma et al., 2017; Zhang et al., 2017a). The results of the present study indicate that the mtDNA copy number was significantly decreased in the BCT samples from patients belonging to haplogroup B2 compare to D1; and C1 compared with BCT patients belonging to haplogroups A2; and D1 compared with his NAT counterpart. This decrease in mtDNA content may cause an imbalance in the cellular metabolic energy that is associated with cancer as previously described (Mei et al., 2015; Yu, 2011).

The mechanisms by which mitochondrial haplogroups are associated with cancer risk have not yet been clearly elucidated. It has been suggested that the D5 haplogroup may promote tumorigenesis through over-activation of AKT that is mediated by increased ROS, as well as a reduced mitochondrial OXPHOS function caused by a decrease in the activity of complexes I and III (Ma et al., 2017). Furthermore, it has been hypothesized that the changes of Ile78Thr in the cytochrome b subunit of respiratory complex III in haplogroup D4a, Ile278Val in ND2, and Ile423Val in ND4 of complex III in haplogroup D5 may have an important role in the production of ROS in Japanese centenarians (Alexe et al., 2007). A significant increase in the activity of mitochondrial respiratory chain complexes I and III in cytoplasmic hybrid (cybrid) cells with haplogroup G has also been observed, resulting in higher amounts of OXPHOS-related ATP, and generated significantly less ROS compared with B4 cybrids, increasing the risk of osteoarthritis

(Fang et al., 2016).

During the study, it was also observed a significant decrease in mtDNA content in BCT samples containing the specific A249del (p = 0.019), and A290del (p = 0.019), and A291del (p = 0.019) polymorphisms. This result is in agreement with previous studies that showed decrease in the mtDNA content in cybrids containing A249del compared to cybrids without the deletion (Zhou et al., 2017). These A249del, A290del, and A291del polymorphism may affect the protein binding between the elements of the mitochondrial DNA replication and/or transcription machineries. Because, in human hepatocellular carcinoma deletions in the D-loop between nucleotide positions 298/306 and 348/356 caused a loss of a binding site very important in the mitochondrial DNA transcription factor (mtTFA) and with the sequence for the synthesis of the RNA primer required for the replication of the heavy-strand (Lee et al., 2004; Shadel and Clayton, 1997). Thus, both replication and transcription defects result in a decrease in the mtDNA content and alterations in OXPHOS as previously discussed (Lee et al., 2005; Meierhofer et al., 2004). Furthermore, patient samples containing the C16327T polymorphism also showed a significant decrease in the mtDNA content compared with patient samples lacking this polymorphism (p = 0.019). To our knowledge, no prior studies have reported this finding.

As mentioned in the results, the four polymorphisms (A249del, A290del, A291del and C16327T) are present in all patient samples belonging to haplogroup C1. It is possible that the deletions may have a role in the regulation of the mtDNA copy number as published before (Lee et al., 2004; Shadel and Clayton, 1997). Future studies will clarified its role in the reduction of mtDNA copy number in cancer tissue.

The mtDNA copy number was increase in patient samples containing C16111T (p = 0.021), G16319A (p = 0.048) and T16362C (p = 0.001) polymorphisms compared with all patient samples lacking them. Similarly, previous studies showed a statistically significant increase in T16362C polymorphism frequency for the malignant melanoma and brain tumour (Altafi et al., 2019; Zhang et al., 2015). In addition, the relative mRNA levels of ND6 and eight tRNAs of cybrids

containing m.16362C polymorphism were higher than m.16362 T which may suggest higher mtDNA content (Zhou et al., 2017). Our results in conjunction with all these data may suggest that the T16362C polymorphism may stabilize the protein regulators binding, increasing the efficiency of the replication and transcription machinery compared to BCT lacking this polymorphism. In addition, because the C16111T variant is in the protein regulators binding region of the elements of the replication machinery TAS, it may suggest its participation in the increase of the replication and transcription efficiency that resulted in mtDNA copy number increase. However, future studies should be conducted to determine the role of this polymorphism in the interaction forces between the regulatory elements of the mtDNA replication and transcription machinery with the polymorphisms identified in this study.

In conclusion, the observed reduction in the mtDNA copy number in BCT of more advanced age patients (> 50), in postmenopausal women, in IDC stages II-III (BCT) and II (NAT) compared with IDC-I (NAT), and in BCT of patients harbouring haplogroups B2, C1, and A249del, A290del, A291del, and C16327T polymorphisms; hypothetically, may cause an imbalance in mitochondrial metabolism by affecting OXPHOS activity, resulting in decreased apoptosis, and an accelerated rate of tumour progression and metastasis as previously reported. Furthermore, the association of mtDNA copy number decreases with the breast cancer stage, and this may be used as a marker of cancer progression.

CRedit author statement

MLM, ED-de-la-C conceived and designed research; E D-de-la-C performed the research, and analysis of data; NG-H, AP-M, C M-M, JCH-C contributed with the data of the breast cancer tissue and collected the samples and the data; ED-de-la-C and AP-M obtained the sequences of the hypervariable region of the mtDNA; all authors contributed with the analysis of the data; MLM and ED-de-la-C wrote the manuscript; and all authors review and approved the manuscript. All authors validate the results/experiments.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We thank the FIS IMSS for their support (FIS/IMSS/PROT/PRIO/17/063, 2017-785-071 and R-2015-785-016); the support granted from CONACYT scholarships CVU 485179, CB 2015/258103, EXP. AYTE. 177559; and the scholarship granted from COMECYT 18BTD0020. We thank Dr. Carlos López Otín from the Department of Biochemistry at the Universidad de Oviedo, Spain for the advice he provided during the development of this research.

Funding

We thank the FIS IMSS for their support: FIS/IMSS/PROT/PRIO/17/063, 2017-785-071 and R-2015-785-016. We also appreciate the support granted from CONACYT scholarships CVU485179, CB 2015/258103, EXP. AYTE 177559, as well as the scholarship granted from COMECYT 18BTD0020.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.145047>.

References

- Achilli, A., Perego, U.A., Bravi, C.M., Coble, M.D., Kong, Q.P., Woodward, S.R., Salas, A., Torroni, A., Bandelt, H.J., 2008. The phylogeny of the four pan-American mtDNA haplogroups: Implications for evolutionary and disease studies. *PLoS One* 3. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001764>.
- Alexe, G., Fuku, N., Bilal, E., Ueno, H., Nishigaki, Y., Fujita, Y., Ito, M., Arai, Y., Hirose, N., Bhanot, G., Tanaka, M., 2007. Enrichment of longevity phenotype in mtDNA haplogroups D4b2b, D4a, and D5 in the Japanese population. *Hum. Genet.* 121, 347–356. <https://doi.org/10.1007/s00439-007-0330-6>.
- Altafi, D., Sadeghi, S., Hojati, H., Afra, M.T., Kar, S.P., Goji, M., Houshmand, M., 2019. Mitochondrial polymorphisms, in the D-loop area, are associated with brain tumors. *Cell J.* 21, 350–356.
- Andrews, R.M., Kubacka, I., Chinnery, P.F., Lightowlers, R.N., Turnbull, D.M., Howell, N., 1999. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* <https://doi.org/10.1038/13779>.
- Bai, R.-K., Leal, S.M., Covarrubias, D., Liu, A., Wong, L.-J.-C., 2007. Mitochondrial genetic background modifies breast cancer risk. *Cancer Res.* 67, 4687–4694. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3554>.
- Bai, R.-K., Chang, J., Yeh, K.T., Lou, M.A., Lu, J.F., Tan, D.J., Liu, H., Wong, L.J.C., 2011. Mitochondrial DNA content varies with pathological characteristics of breast cancer. *J. Oncol.* <https://doi.org/10.1155/2011/496189>.
- Barroso-Sousa, R., Metzger-Filho, O., 2016. Differences between invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast: Results and therapeutic implications. *Ther. Adv. Med. Oncol.* <https://doi.org/10.1177/1758834016644156>.
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, L., Ostell, J., Kim, D.P., Sayers, E.W., 2018. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 46, D41–D47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1094>.
- Booker, L.M., Habermacher, G.M., Jessie, R.C., Sun, Q.C., Baumann, A.K., Amin, M., Lim, S.D., Fernandez-Galarz, C., Lyles, R.H., Brown, M.D., Marshall, F.F., Petros, J.A., 2006. North American white mitochondrial haplogroups in prostate and renal cancer. *J. Urol.* 175, 468–473. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)00163-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)00163-1).
- 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, 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- Burke, P.J., 2017. Mitochondria, Bioenergetics and Apoptosis in Cancer. *Trend. Cancer* 3 (12), 857–870. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.10.006>.
- Caudron-Herger, M., Diederichs, S., 2018. Mitochondrial mutations in human cancer: Curation of translation. *RNA Biol.* 15, 62–69. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1373239>.
- Chandra, D., Singh, K.K., 2011. Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.023>.
- Chang, Y.K., Kim, D.E., Cho, S.H., Kim, J.H., 2016. Association between leukocyte mitochondrial DNA copy number and regular exercise in postmenopausal women. *Korean J. Fam. Med.* 37, 334–339. <https://doi.org/10.4082/kjfm.2016.37.6.334>.
- Colditz, G.A., Bohlke, K., 2014. Priorities for the primary prevention of breast cancer. *CA. Cancer J. Clin.* 00, 1–9. <https://doi.org/10.3322/caac.21225>.
- Derenko, M., Malyarchuk, B., Grzybowski, T., Denisova, G., Rogalla, U., Perkova, M., Dambueva, I., Zakharov, L., 2010. Origin and post-glacial dispersal of mitochondrial DNA haplogroups C and D in Northern Asia. *PLoS One* 5, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015214>.
- Dey, R., Momes, C.T., 2000. Lack of oxidative phosphorylation and low mitochondrial membrane potential decrease susceptibility to apoptosis and do not modulate the protective effect of Bcl-x(L) in osteosarcoma cells. *J. Biol. Chem.* 275, 7087–7094. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.10.7087>.
- Dong, J., Wong, L.J., Mims, M.P., 2018. Mitochondrial inheritance and cancer. *Transl. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.06.004>.
- Fan, A.X.C., Radpour, R., Haghghi, M.M., Kohler, C., Xia, P., Hahn, S., Holzgreve, W., 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, 983–989. <https://doi.org/10.1007/s00432-008-0533-9>.
- Fang, H., Shen, L., Chen, T., He, J., Ding, Z., Wei, J., Qu, J., Chen, G., Lu, J., Bai, Y., 2010. Cancer type-specific modulation of mitochondrial haplogroups in breast, colorectal and thyroid cancer. *BMC Cancer* 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-421>.
- Fang, H., Zhang, F., Li, F., Shi, H., Ma, L., Du, M., You, Y., Qiu, R., Nie, H., Shen, L., Bai, Y., Liu, J., 2016. Mitochondrial DNA haplogroups modify the risk of osteoarthritis by altering mitochondrial function and intracellular mitochondrial signals. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1862, 829–836. <https://doi.org/10.1016/j.bbadi.2015.12.017>.
- Filho, O.M., Giobbie-Hurder, A., Mallon, E., Gusterson, B., Viale, G., Winer, E.P., Thürlimann, B., Gelber, R.D., Colleoni, M., Ejlersen, B., Deblad, M., Price, K.N., Regan, M.M., Coates, A.S., Goldhirsch, A., 2015. Relative effectiveness of letrozole compared with tamoxifen for patients with lobular carcinoma in the BIG 1–98 Trial. *J. Clin. Oncol.* 33, 2772–2778. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.60.8133>.
- Fliss, M.S., Usadel, H., Caballero, O.L., Wu, L., Buta, M.R., Eleff, S.M., Jen, J., Sidransky, D., 2000. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science* (80-) 287, 2017–2019. <https://doi.org/10.1126/science.287.5460.2017>.
- Gaude, E., Frezza, C., 2016. Tissue-specific and convergent metabolic transformation of cancer correlates with metastatic potential and patient survival. *Nat. Commun.* 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13041>.
- Herrnstadt, C., Howell, N., 2004. An evolutionary perspective on pathogenic mtDNA mutations: Haplogroup associations of clinical disorders. *Mitochondrion* 4, 791–798.

- <https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.07.041>.
- Huang, B., Gao, Y.T., Shu, X.O., Wen, W., Yang, G., Li, G., Courtney, R., Ji, B.T., Li, H.L., Purdie, M.P., Zheng, W., Cai, Q., 2014. Association of leukocyte mitochondrial DNA copy number with colorectal cancer risk: Results from the Shanghai Women's Health Study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 23, 2357–2365. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-14-0297>.
- INFOCANCER, 2019. "ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL... DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO)" DATOS NACIONALES [WWW Document]. URL <https://www.infoconcer.org.mx/?c=cancer-cifras&a=estadisticas-2018> (accessed 2.7.20).
- Jiang, H., Zhao, H., Xu, H., Hu, L., Wang, W., Wei, Y., Wang, Y., Peng, X., Zhou, F., 2014. Peripheral blood mitochondrial DNA content, A10398G polymorphism, and risk of breast cancer in a Han Chinese population. *Cancer Sci.* 105, 639–645. <https://doi.org/10.1111/cas.12412>.
- Keserü, J.S., Soltész, B., Lukács, J., Márton, É., Szilágyi-Bónizs, M., Penyige, A., Póka, R., Nagy, B., 2019. Detection of cell-free, exosomal and whole blood mitochondrial DNA copy number in plasma or whole blood of patients with serous epithelial ovarian cancer. *J. Biotechnol.* 298, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.04.015>.
- Kumar, S., Bellis, C., Zlotutro, M., Melton, P.E., Blangero, J., Curran, J.E., 2011. Large scale mitochondrial sequencing in Mexican Americans suggests a reappraisal of Native American origins. *BMC Evol. Biol.* 11, 293. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-293>.
- Lee, H.C., Li, S.H., Lin, J.C., Wu, C.C., Yeh, D.C., Wei, Y.H., 2004. Somatic mutations in the D-loop and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 547, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.12.011>.
- Lee, H.C., Yin, P.H., Lin, J.C., Wu, C.C., Chen, C.Y., Wu, C.W., Chi, C.W., Tam, T.N., Wei, Y.H., 2005. Mitochondrial genome instability and mtDNA depletion in human cancers. in: *Annals of the New York Academy of Sciences*. New York Academy of Sciences, pp. 109–122. <https://doi.org/10.1196/annals.1338.011e>.
- Liberti, M.V., Locasale, J.W., 2016. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>.
- Lin, C.S., Wang, L.S., Tsi, C.M., Wei, Y.H., 2008. Low copy number and low oxidative damage of mitochondrial DNA are associated with tumor progression in lung cancer tissues after neoadjuvant chemotherapy. *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 7, 954–958. <https://doi.org/10.1510/icvts.2008.177006>.
- Lin, C.S., Lee, H.T., Lee, S.Y., Shen, Y.A., Wang, L.S., Chen, Y.J., Wei, Y.H., 2012. High mitochondrial DNA copy number and bioenergetic function are associated with tumor invasion of esophageal squamous cell carcinoma cell lines. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 11228–11246. <https://doi.org/10.3390/ijms130911228>.
- Luchini, C., Nottegar, A., Vaona, A., Stubbs, B., Demurtas, J., Maggi, S., Veronese, N., 2018. Female-specific association among I, J and K mitochondrial genetic haplogroups and cancer: A longitudinal cohort study. *Cancer Genet.* 224–225, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2018.04.003>.
- Lynch, S.M., Weinstein, S.J., Vitramo, J., Lan, Q., Liu, C.S., Cheng, W.L., Rothman, N., Albanes, D., Stolzenberg-Solomon, R.Z., 2011. Mitochondrial DNA copy number and pancreatic cancer in the alpha-tocopherol beta-carotene cancer prevention study. *Cancer Prev. Res.* 4, 1912–1919. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0002>.
- Ma, L., Fu, Q., Xu, B., Zhou, H., Gao, J., Shao, X., Xiong, J., Gu, Q., Wen, S., Li, F., Shen, L., Chen, G., Fang, H., Lyu, J., 2017. Breast cancer-associated mitochondrial DNA haplogroup promotes neoplastic growth via ROS-mediated AKT activation. *Int. J. Cancer* 00, 1–11. <https://doi.org/10.1002/ijc.31207>.
- Makki, J., 2015. Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. *Clin. Med. Insights Pathol.* 8, 23–31. <https://doi.org/10.4137/CPath.s31563>.
- Mei, H., Sun, S., Bai, Y., Chen, Y., Chai, R., Li, H., 2015. Reduced mtDNA copy number increases the sensitivity of tumor cells to chemotherapeutic drugs. *Cell Death Dis.* 6. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.78>.
- Meierhofer, D., Mayr, J.A., Foetschl, U., Berger, A., Fink, K., Schmeller, N., Hacker, G.W., Hauser-Kronberger, C., Kofler, B., Sperl, W., 2004. Decrease of mitochondrial DNA content and energy metabolism in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 25, 1005–1010. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh104>.
- Mizuno, F., Gojobori, J., Wang, L., Onishi, K., Sugiyama, S., Granados, J., Gomez-Trejo, C., Acuña-Alonso, V., Ueda, S., 2014. Complete mitogenome analysis of indigenous populations in Mexico: Its relevance for the origin of Mesoamericans. *J. Hum. Genet.* 59, 359–367. <https://doi.org/10.1038/hjg.2014.35>.
- Reznik, E., Miller, M.L., Şenbabaoglu, Y., Riaz, N., Sarungbam, J., Tickoo, S.K., Al-Ahmadie, H.A., Lee, W., Seshan, V.E., Hakim, A.A., Sander, C., 2016. Mitochondrial DNA copy number variation across human cancers. *Elife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.10769>.
- Sánchez-Angé, M., Chamorro, M., Cuezva, J.M., 2010. Selection of cancer cells with repressed mitochondria triggers colon cancer progression. *Carcinogenesis* 31, 567–576. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq012>.
- Shadel, G.S., Clayton, D.A., 1997. MITOCHONDRIAL DNA MAINTENANCE IN VERTEBRATES. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 409–435. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.409>.
- Skol, A.D., Sasaki, M.M., Onel, K., 2016. The genetics of breast cancer risk in the post-genome era: thoughts on study design to move past BRCA and towards clinical relevance. *Breast Cancer Res.* 18, 99. <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0759-4>.
- Song, S., Pursell, Z.F., Copeland, W.C., Longley, M.J., Kunkel, T.A., Mathews, C.K., 2005. DNA precursor asymmetries in mammalian tissue mitochondria and possible contribution to mutagenesis through reduced replication fidelity.
- Sun, Y., Gu, J., Ajani, J.A., Chang, D.W., Wu, X., Ströhlein, J.R., 2014. Genetic and intermediate phenotypic susceptibility markers of gastric cancer in Hispanic Americans: A case-control study. *Cancer* 120, 3040–3048. <https://doi.org/10.1002/ncr.28792>.
- Szcepanowska, K., Trifunovic, A., 2015. Different faces of mitochondrial DNA mutators. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.05.016>.
- Tomiyama, A., Serizawa, S., Tachibana, K., Sakurada, K., Samejima, H., Kuchino, Y., Kitahara, C., 2006. Critical role for mitochondrial oxidative phosphorylation in the activation of tumor suppressors Bax and Bak. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 1462–1473. <https://doi.org/10.1093/jnci/dj395>.
- Tong, H., Zhang, L., Gao, J., Wen, S., Zhou, H., Feng, S., 2017. Methylation of mitochondrial DNA displacement loop region regulates mitochondrial copy number in colorectal cancer. *Mol. Med. Rep.* 16, 5347–5353. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7264>.
- Vigilant, L., Pennington, R., Harpending, H., Kocher, T.D., Wilson, A.C., 1989. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 9350–9354. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.23.9350>.
- Wachsmuth, M., Hübner, A., Li, M., Madea, B., Stoneking, M., 2016. Age-Related and Heteroplasmy-Related Variation in Human mtDNA Copy Number. *PLoS Genet.* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005939>.
- Wang, Y., Liu, V.W.S., Xue, W.C., Tsang, P.C.K., Cheung, A.N.Y., Ngan, H.Y.S., 2005. The increase of mitochondrial DNA content in endometrial adenocarcinoma cells: A quantitative study using laser-captured microdissected tissues. *Gynecol. Oncol.* 98, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.ygyo.2005.04.015>.
- Xia, C.Y., 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, 2435–2440. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.216395>.
- Xu, Y.Y., Xu, L.L., Han, M., Liu, X.T., Li, F., Zhou, X.Y., Wang, Y., Bi, J.Z., 2019. Altered mitochondrial DNA methylation and mitochondrial DNA copy number in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 520, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.09.094>.
- Yin, P.H., Lee, H.C., Chau, G.Y., Wu, Y.T., Li, S.H., Lui, W.Y., Wei, Y.H., Liu, T.Y., Chi, C.W., 2004. Alteration of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* 90, 2390–2396. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601838>.
- Yu, M., 2011. Generation, function and diagnostic value of mitochondrial DNA copy number alterations in human cancers. *Life Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.05.010>.
- Yu, M., Zhou, Y., Shi, Y., Ning, L., Yang, Y., Wei, X., Zhang, N., Hao, X., Niu, R., 2007. Reduced mitochondrial DNA copy number is correlated with tumor progression and prognosis in Chinese breast cancer patients. *IUBMB Life* 59, 450–457. <https://doi.org/10.1080/15216540701509955>.
- Yusoff, A.A.M., Abdullah, W.S.W., Khair, S.Z.N.M., Radzak, S.M.A., 2019. A comprehensive overview of mitochondrial DNA 4977-bp deletion in cancer studies. *Oncol. Rev.* <https://doi.org/10.4081/oncol.2019.409>.
- Zhang, Q., Liang, Z., Gao, Y., Teng, M., Niu, L., 2017a. Differentially expressed mitochondrial genes in breast cancer cells: Potential new targets for anti-cancer therapies. *Gene* 596, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.10.005>.
- Zhang, R., Wang, Y., Ye, K., Picard, M., Gu, Z., 2017b. Independent impacts of aging on mitochondrial DNA quantity and quality in humans. *BMC Genomics* 18. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4287-0>.
- Zhang, W., Wang, W., Jia, Z., 2015. Single nucleotide polymorphisms in the mitochondrial displacement loop region modifies malignant melanoma: A study in Chinese Han population. *Mitochondrial DNA* 26, 205–207. <https://doi.org/10.3109/19401736.2014.900613>.
- Zhang, Y., Zhao, Y., Wen, S., Yan, R., Yang, Q., Chen, H., 2017c. Associations of mitochondrial haplogroups and mitochondrial DNA copy numbers with end-stage renal disease in a Han population. *Mitochondrial DNA Part A DNA Mapping. Seq. Anal.* 28, 725–731. <https://doi.org/10.1080/24701394.2016.1177038>.
- Zhou, H., Nie, K., Qiu, R., Xiong, J., Shao, X., Wang, B., Shen, L., Lyu, J., Fang, H., 2017. Generation and Bioenergetic Profiles of Cybrids with East Asian mtDNA Haplogroups. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1062314>.
- Zhou, W., Zhu, M., Gui, M., Huang, L., Long, Z., 2014. Peripheral Blood Mitochondrial DNA Copy Number Is Associated with Prostate Cancer Risk and Tumor Burden. *PLoS One* 9, 109470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109470>.

12.3 Participación en otros proyectos.

Data in Brief 32 (2020) 106077



Contents lists available at ScienceDirect

Data in Brief

journal homepage: www.elsevier.com/locate/dib



Data Article

Dataset on the epidemiology and genetic diversification of dengue virus (DENV) serotypes and genotypes in Mexico



Eduardo Domínguez-de-la-Cruz^a, María de Lourdes Muñoz^{a,*},
Ericel Hernández-García^a, Gerardo Pérez-Ramírez^a,
Randy E. David^b, Joel Navarrete-Espinosa^c, Álvaro Díaz-Badillo^d,
Miguel Moreno-Galeana^a, Cesar Armando Brito-Carreón^a

^aDepartment of Genetics and Molecular Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV-IPN), Mexico City, Mexico

^bLaboratories of Biological Anthropology, University of Kansas, Lawrence, KS, USA

^cEpidemiology Division, Coordination of Integrated Health Programs, Mexican Social Security Institute, Mexico City, Mexico

^dUniversity of Texas Rio Grande Valley, Department of Human Genetics and South Texas Diabetes and Obesity Institute, TX, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 June 2020

Revised 18 July 2020

Accepted 20 July 2020

Available online 29 July 2020

Keywords:

Dengue fever

DENV genotypes

DENV serotypes

Epidemiology

Evolutionary virology

Introduction of novel genotypes

Phylogeny

Severe dengue

ABSTRACT

Dengue virus (DENV) evolution has had a significant impact on disease pathogenesis, virulence, and epidemiology in Mexico. Novel genotypic variation in DENV serotypes and genotypes may influence the magnitude and severity of dengue epidemics, as evidenced by 2009 data from Veracruz State. The data presented herein is related to the publication entitled "Epidemiological Implications of the Genetic Diversification of Dengue Virus (DENV) Serotypes and Genotypes in Mexico" [1]. Raw data and trees provide epidemiological data on DENV prevalence and a comprehensive phylogeny of both representative sequences collected from an NCBI repository, and 28 additional isolates from acute-phase plasma samples diagnosed with dengue fever or severe dengue (Raw sequencing data is hosted in the public repository Mendeley Data (<http://dx.doi.org/10.17632/bf2kdhhf6x.2>). Phylogenetic

DOI of original article: [10.1016/j.meegid.2020.104391](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104391)

* Corresponding author.

E-mail address: lmunoz@cinvestav.mx (M.d.L. Muñoz).



Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid



Epidemiological implications of the genetic diversification of dengue virus (DENV) serotypes and genotypes in Mexico



Ericel Hernández-García^a, Maria de Lourdes Muñoz^{a,*}, Randy E. David^b, Gerardo Pérez-Ramírez^a, Joel Navarrete-Espinosa^c, Álvaro Díaz-Badillo^d, Eduardo Domínguez-de-la-Cruz^a, Miguel Moreno-Galeana^a, Cesar Armando Brito-Carreón^a

^a Department of Genetics and Molecular Biology, Center for Research and Advanced Studies of the National Polytechnic Institute (CINVESTAV—IPN), Mexico City, Mexico

^b Laboratories of Biological Anthropology, University of Kansas, Lawrence, KS, USA

^c Epidemiology Division, Coordination of Integrated Health Programs, Mexican Social Security Institute, Mexico City, Mexico

^d University of Texas, Rio Grande Valley, Department of Human Genetics and South Texas Diabetes and Obesity Institute, TX, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Emergence of new genotypes
Geographic distribution of DENV serotypes
Phylogenetic analysis of dengue
Dengue epidemiology

ABSTRACT

Variation and clade shifts in dengue virus (DENV) genotypes are responsible for numerous dengue fever outbreaks throughout Latin America in the past decade. Molecular analyses of dengue serotypes have revealed extensive genetic diversification and the emergence of new genotypes in Brazil (DENV-4 genotype I) and elsewhere in tropical and subtropical America. The goal of the present study is to assess the extent to which the adventitious introduction of DENV genotypes and their increasing genetic diversity affects dengue epidemiology in Mexico. A nuanced sequence inspection and phylogenetic analysis of the C-prM nucleotide region of DENV was performed for specimens collected in 2009 from the Veracruz State, Mexico. Findings were contrasted with specimens collected in adjacent years and analysed based on the epidemiological patterns reported between 1990 and 2019. Additionally, the identification process of various DENV genotypes was assessed, including: (1) DENV-1, genotype V, (2) the DENV-2 Asian/American and Asian II genotypes (3) DENV-3, genotype III, and (4) DENV-4, genotype I. This resulted in the discovery of a distinct genetic cladistic pattern for serotype DENV-2. Lastly, study findings suggest that a correlation exists between the emergence of novel genotypes and genetic diversification, with the increasing incidence of DENV infections in Mexico in 2009.



A novel method of male sex identification of human ancient skeletal remains

María Teresa Navarro-Romero · María de Lourdes Muñoz · Enrique Alcala-Castañeda · Eladio Terreros-Espinosa · Eduardo Domínguez-de-la-Cruz · Normand García-Hernández · Miguel Ángel Moreno-Galeana

Received: 27 March 2020 / Revised: 19 June 2020 / Accepted: 23 June 2020
© Springer Nature B.V. 2020

Abstract Sex identification of ancient individuals is important to understand aspects of the culture, demographic structure, religious practices, disease association, and the history of the ancient civilizations. Sex identification is performed using anthropometric measurements and molecular genetics techniques, including quantification of the X and Y chromosomes. These

approaches are not always reliable in subadult, or fragmented, incomplete skeletons or when the DNA is highly degraded. Most of the methods include the identification of the male and female sexes, but the absence of a specific marker for the males does not mean that the sample obtained was from a female. This study aims (1) to identify new male-specific regions that allow male identification; (2) to contrast the effectiveness of these markers against AMELX/AMELY and anthropometric measurement procedures; and (3) to test the efficacy of these markers in archaeological samples. For the first two aims, we used known sex samples, and for the third aim, we used samples from different archaeological sites. A novel molecular technique to identify male-specific regions by amplification of *TTY7*, *TSPY3*, *TTY2*, and *TTY22* genes of the human Y chromosome was developed. The results showed amplification of the specific DNA regions of Y chromosome in male individuals, with no amplification being observed in any of the female samples, confirming their specificity for male individuals. This approach complements the current procedures, such as the AMELX/AMELY test and anthropometric principle.

Responsible Editor: Irina Solovei

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10577-020-09634-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. T. Navarro-Romero · M. d. L. Muñoz · E. Domínguez-de-la-Cruz · M. Á. Moreno-Galeana
Department of Genetics and Molecular Biology, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, Gustavo A. Madero, C.P. 7360, Mexico City, Mexico
e-mail: lmunoz@cinvestav.mx

E. Alcala-Castañeda
Department of Archaeological Studies, Instituto Nacional de Antropología e Historia, Lic. Verdad 3, Centro Histórico, 06000 Mexico City, Mexico

E. Terreros-Espinosa
Templo Mayor Museum, Instituto Nacional de Antropología e Historia, Seminario 8, Centro Histórico, 06060 Mexico City, Mexico

N. García-Hernández
Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freud”, Centro Médico Nacional “Siglo XXI”, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Av. Cuauhtémoc 330, Doctores, 06720 Mexico City, Mexico

Keywords Y chromosome; · Ancient DNA; · AMEL test; · Male sex identification; · Pre-Hispanic bone remains

Abbreviations

Chr-X X chromosome
Chr-Y Y chromosome

Published online: 03 July 2020

Springer