

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

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Evaluación del estado de metilación del mtDNA en cáncer de mama en mujeres  
mexicanas**

Tesis que presenta

**M. en C. Ashael Alfredo Pérez Muñoz**

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**

**Dr. Normand García Hernández**

Ciudad de México

Agosto, 2020



Gracias al CONACYT, por la beca otorgada al autor de este proyecto con Número de Registro: **CB258103** para la realización de mis estudios de Doctorado, así como por el financiamiento otorgado por el CONACYT, con el número CB258103. También, quiero agradecer al Fondo de Investigación en Salud (FIS), del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), por el apoyo financiero otorgado con el número de proyecto FIS/IMSS/PROT/PRI0/17/063, R-2017-785-071. Gracias por ser instituciones comprometidas con el desarrollo científico, que contribuyeron al desarrollo de este proyecto, el cual se llevó a cabo en el Laboratorio 1 del Departamento de Genética y Biología Molecular de CINVESTAV-IPN, Unidad Zacatenco, Ciudad de México; en conjunto con el Laboratorio de Genómica Funcional y Proteómica, Hospital de Pediatría, Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Centro Médico Nacional S-XXI, IMSS.



Este trabajo fue realizado en el laboratorio No 1 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN; en conjunto con el Laboratorio de Genómica Funcional y Proteómica, Hospital de Pediatría, Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Centro Médico Nacional S-XXI, IMSS bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno y el Dr. Normand García Hernández.

El trabajo estuvo bajo la asesoría de: La Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, el Dr. Javier Hernández Sánchez y el Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe, del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN; y la Dra. Norma Estela Herrera Gonzales de la Escuela Superior de Medicina del IPN.



---

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. María de Lourdes Muñoz Moreno, por su apoyo y comprensión en estos años trabajando juntos, muchas gracias por recibirme en su laboratorio y por todas las enseñanzas que me ha transmitido a lo largo de esta aventura llamada posgrado, juntos, agradezco infinitamente su paciencia y la oportunidad que me dio.

Al Dr. Normand García Hernández, por aceptar participar como co-director en la realización de este trabajo, lo que me permitió conocer e interactuar con su equipo de trabajo y llegar a buen puerto en este capítulo de mi vida. Agradezco profundamente sus enseñanzas.

A mis asesores, la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, el Dr. Luis Yoshio Kameyama Kawabe, el Dr. Javier Hernández Sánchez y la Dra. Norma Herrera Gonzales de la Escuela por sus siempre oportunas observaciones, algunos desde la maestría, los aprecio en demasía y agradezco cada uno de sus consejos.

A mis compañeros del laboratorio 1, Lalo, Gerry, Angie, Migue, César, Heriberto, Rosi, Miri, Armando; y de Centro Médico, Alex, Pina y Monse, por brindarme sus sugerencias para la mejora de este trabajo.

A Hebert Cadena García por el apoyo técnico brindado para la realización de este trabajo, siempre amable, siempre con una sonrisa.

A Guadalupe Aguilar González, responsable de la Unidad de Ácidos Nucleicos, por el apoyo técnico indispensable para la obtención de las secuencias de interés.

Así mismo quiero agradecer a Caro y Javier del laboratorio de secuenciación del Hospital de Especialidades del CMN Siglo XXI por su apoyo en obtención de secuencias.



---

## DEDICATORIAS

A toda mi familia, pero en especial a mi Abue Custo, muchas gracias por apoyar a su nieto loco en esta aventura que empezó hace 10 años, con una maleta llena de esperanza e ilusiones que acepto en su casa, es una lástima que ya no esté con nosotros para ver el cierre de este capítulo de mi vida, pero que sin su apoyo yo no hubiera podido llegar hasta acá, siempre la voy a amar y llevar en mi corazón, descansa en paz y pronto nos reuniremos otra vez.

A mis padres Guadalupe y Patricio, que siempre han estado para mí y que me han apoyado en todas mis locuras, a mis hermanas Cinthia e Itzelt, que son un gran pilar en mí desarrollo como persona, a mis sobrinos Gio, Alon y Marnecita, que son un gran apoyo y un motor para seguir adelante y ser un gran ejemplo para ellos.

A Giss, mi pareja de vida, que a pesar de todo sigue a mi lado apoyándome y creciendo juntos, sé que llegaremos lejos muy lejos, te amo y este triunfo es de ambos.

En especial éste trabajo lo quiero dedicar a todas esas mujeres que amablemente nos apoyaron, donando su tejido para llevar a cabo este proyecto.

Además, quiero hacer una mención especial a las mujeres de mi vida, mi mamá que es una luchadora incansable, ya que inicie mis estudios en cáncer de mama, porque fue detectada con esta enfermedad, a Giss el amor de mi vida y compañera de vida, que a tu lado he crecido enormemente, siempre sacas lo mejor de mí.



## Índice.

Índice.....	6
Índice de figuras.....	8
Índice de tablas.....	11
Abstract.....	12
Resumen.....	13
I Introducción.....	14
1.1. Cáncer.....	14
1.2 Cáncer de mama.....	15
1.2.1 Clasificación del cáncer de mama.....	15
1.2.1.1 Clasificación molecular del cáncer de mama.....	18
1.2.2 Epidemiología del cáncer mamario.....	20
1.2.3 Biología del CaMa.....	21
1.3. Mitocondria y DNA mitocondrial.....	24
1.4 Cáncer y mtDNA.....	27
1.5 Cáncer de mama y mtDNA.....	27
1.6 Epigenética y cáncer de mama.....	33
1.7 Epigenética del mtDNA.....	34
II Justificación.....	37
III Hipótesis.....	38
IV Objetivos.....	39
4.1 Objetivo general.....	39
4.2 Objetivos Particulares.....	39
V Materiales y métodos.....	40
5.1 Material biológico.....	40
5.2 Extracción y cuantificación de DNA total.....	40
5.3 Amplificación y secuenciación de la región D-loop del mtDNA.....	40
5.4 Determinación de los haplogrupos mtDNA.....	41
5.5 Tratamiento con bisulfito y controles negativos de metilación.....	42
5.6 Identificación de los perfiles de metilación en la región D-loop del mtDNA..	44
5.7 Análisis estadísticos.....	46



---

VI Resultados.....	47
6.1 Características de las muestras recolectadas.....	47
6.2 Determinación de los haplogrupos y subhaplogrupos del mtDNA.....	49
6.3 Variantes mitocondriales en las muestras de pacientes.....	55
6.4 Asociación de los haplogrupos o variantes con cáncer de mama.....	58
6.5 Identificación del perfil de metilación en la región D-loop del mtDNA.....	60
6.6 Asociación del perfil de metilación y CaMa.....	66
VII Discusión.....	67
VIII Conclusiones.....	70
IX Perspectivas.....	71
X Anexos.....	72
Anexo 1.....	72
Anexo 2.....	75
XI Referencias.....	89



## Índice de figuras.

- Figura 1.** Anatomía e histología de la glándula mamaria. Se observa los elementos de la glándula mamaria: lóbulos, conductos, areola, pezón. . 15
- Figura 2.** Gráfica de número de casos nuevos de CaMa diagnosticados en las diferentes regiones de la OMS en 2018..... 20
- Figura 3.** Gráfica de incidencia de CaMa por país. Fuente de datos Globocan 2018 [4]. ..... 21
- Figura 4.** Genoma mitocondrial humano. El mtDNA incluye la región no codificante D-loop, el cual está involucrado en la regulación de la transcripción y replicación del DNA. La región codificante comprende; 7 subunidades del complejo I, 1 subunidad del complejo III, 3 del complejo IV y 2 del complejo V de la OXPHOS. Los genes que codifican para las subunidades 12S y 16S del rRNA. OH y OL indican los orígenes de replicación de las cadenas pesada y ligera, respetivamente. HSP; promotor de la cadena pesada, LSP; promotor de la cadena ligera, TFAM; factor de transcripción A mitocondrial, POLRM; RNA polimerasa mitocondrial, MTERF; factor de terminación mitocondrial, HVR 1 y 2; regiones hipervariables 1 y 2, CSB 1, 2 y 3; bloques de secuencias conservadas Tomado de Nicholls et al, [25]. ..... 25
- Figura 5.** Origen y migración de los haplogrupos mitocondriales en el mundo. Tomado de <https://www.mitomap.org/foswiki/pub/MITOMAP>..... 26
- Figura 6.** Variantes del mtDNA asociadas a diferentes tipos de cáncer. Se observa el diagrama del mtDNA, la localización de los genes mitocondriales y su región no codificante, así como las variantes del mtDNA asociadas a cáncer humano. **BLA**, cáncer de vejiga; **BRE**, cáncer de mama; **CER**, cáncer cervical; **COL**, cáncer de colon; **END**, cáncer de endometrio; **EPH**, cáncer de esófago; **GAS**, cáncer gástrico; **GLB**, glioblastoma; **HNK**, cáncer de cabeza y cuello; **LUK**, leucemia; **LVR**, cáncer de hígado; **LUN**, cáncer de pulmón; **OTS**, osteosarcoma; **OVR**, cáncer de ovario; **PNC**, cáncer pancreático; **PST**, cáncer de próstata; **THY**, cáncer de tiroides. Tomada de Jiménez-Morales et al [29]. ..... 28
- Figura 7.** Gráfica de discriminación alélica para el HgA. El grupo de puntos de color rojo indican las muestras que presentaron el alelo A; los puntos de color azul corresponden al alelo G. .... 50
- Figura 8.** Gráfica de discriminación alélica para el HgC. El color rojo indica las muestras que presentaron el alelo A; los puntos de color azul corresponden al alelo G. .... 50





<b>Figura 9.</b> Gráfica de discriminación alélica del HgD. Los puntos de color rojo indican las muestras que presentan el alelo T; los puntos de color azul corresponden al alelo G, muestras que presenta.....	51
<b>Figura 10.</b> Electroforesis del producto de PCR para identificar la delección 8281-8289 característica del HgB. <b>PM</b> = Marcador de Peso Molecular, <b>C-</b> = Agua libre de nucleasas, <b>C-</b> = Muestra diferente de HgB, <b>C+</b> = Muestra HgB. ....	51
<b>Figura 11.</b> Electroforesis del amplificon de la región D-loop del mtDNA. Producto de 1463 pb de las muestras 31-34 <b>PM</b> = Marcador de peso molecular; <b>C-</b> Control negativo; <b>C+</b> = Control positivo; <b>A</b> = Tejido adyacente; <b>T</b> = Tejido tumoral. ....	52
<b>Figura 12.</b> Alineamiento y comparación de la secuencia problema con CRS. ....	52
<b>Figura 13.</b> Ejemplo de secuencia de HgA obtenido de la base de datos Mitomap. Se observa las Hg y las variantes mitocondriales identificadas en la secuencia de la muestra WT35 mediante el uso de Mitomap .....	53
<b>Figura 14.</b> Haplogrupos identificados. Controles (N=176). Pacientes (N=210). ....	53
<b>Figura 15.</b> Subhaplogrupos del HgA identificados en el estudio. Controles (N=77); Pacientes (N= 126). ....	56
<b>Figura 16.</b> Subhaplorupos del HgB identificados en el proyecto. Controles (N= 49), Pacientes (N=23). ....	56
<b>Figura 17.</b> Subhaplogrupos del HgC. Controles (N=35) Pacientes (N= 42). ....	57
<b>Figura 18.</b> Subhaplogrupos del HgD presentes en las muestras. Controles (N=4), Pacientes (N=4) .....	57
<b>Figura 19.</b> Sub-haplogrupos no amerindios en los grupos. Controles (N=8), Pacientes (N=9). ....	58
<b>Figura 20.</b> Electroferogramas de las muestras WS5, WS7 y WS14, con y sin tratamiento con bisulfito, así como sus controles negativos. Control de la conversión de bisulfito de DNA (A); secuencia del DNA sin tratamiento (B); secuencias de DNA con tratamiento con bisulito (C); Secuencias consenso de DNA de cada panel (D). La flecha indica el sitio de metilación en cada panel; y en D los están encerrados en un cuadrado. ....	61
<b>Figura 21.</b> Porcentaje del promedio y de los dinucleótidos CpA, CpC, CpG y CpT. Se muestra la desviación estándar y el cambio estadísticamente significativo *** (p=0.001). ....	64



**Figura 22.** Frecuencia y distribución de la metilación en la región D-loop del mtDNA. \*\*\* muestra la desviación estándar; estadísticamente significativo  $p = 0.001$ ..... 65

**Figura 23.** Representación esquemática de la distribución de frecuencia de la metilación del mtDNA en la región D-loop. HVI y HVII están representados en verde y azul, respectivamente; los elementos reguladores se muestran de la siguiente manera: OH, origen de replicación de la cadena pesada; CSBI, CSBII y CSBIII, bloques de secuencia conservada I, II y III respectivamente; TAS, secuencia asociada a la terminación; LSP, promotor de cadena ligera; mt5, elemento de control y mt3L, elemento de control de cadena L. .... 65

**Figura 24.** Porcentaje y distribución de la metilación en CpA, CpC, CpG y CpT en la región D-loop del mtDNA. Muestra los valores promedio de la frecuencia de metilación en las tres zonas de las 42 muestras analizadas en este estudio. .... 66



## Índice de tablas.

<b>Tabla 1.</b>	Clasificación del sistema TNM para CaMa. ....	17
<b>Tabla 2.</b>	Grado de estadio anatómico del CaMa. ....	19
<b>Tabla 3.</b>	Variantes en le mtDNA asociadas al CaMa en diferentes poblaciones. ....	¡Error! Marcador no definido.
<b>Tabla 4.</b>	Haplogrupos asociados a CaMa.....	32
<b>Tabla 5.</b>	Secuencia de las sondas TacMan usadas para identificar los Hg A, B y D. ....	42
<b>Tabla 6.</b>	Secuencia, localización y temperatura de alineamiento de los primers usados en la RT-PCR para cada fragmento en la región D-loop de mtDNA. ....	45
<b>Tabla 7.</b>	Muestras recolectadas para este estudio en el CMN “La Raza”.....	47
<b>Tabla 8.</b>	Características clínicas y epidemiológicas de las muestras diagnosticadas con CaMa. ....	49
<b>Tabla 9.</b>	Haplogrupos y subhaplogrupos de muestras problemas y controles, así como su frecuencia. ....	54
<b>Tabla 10.</b>	Variantes de los haplogrupos no amerindios.....	57
<b>Tabla 11.</b>	Análisis de asociación de haplogrupos y subhaplogrupos mitocondriales con la presencia CaMa.....	58
<b>Tabla 12.</b>	Contenido de dinucleótidos totales y metilados de cada una de las muestras, así como su frecuencia correspondiente. ....	62



### **Abstract.**

Cancer is a term that designates a group of diseases, which may affect any part of the body, is characterized by the uncontrolled growth of abnormal cells in the body. Currently, breast cancer is a public health priority worldwide and in Mexico as the most frequent malignancy in women. Variants in the mitochondrial genome have been shown to confer risk and are related to the ethnic origin of the population, with these variations being more frequent in the D-loop region. In the last decades, there is growing evidence that some mitochondrial haplogroups can act as a risk and / or protection factor in cancer, in addition to the mitochondrial epigenetics that have been associated with the severity of diseases, such as non-alcoholic fatty liver, diabetes, Alzheimer's, among others. Therefore, in the present study, the mitochondrial haplogroup was determined by real-time PCR and sequencing of the D-loop, from 210 samples from Mexican patients diagnosed with breast cancer. It was observed that the Amerindian haplogroups represented: A 61.76%, B 11.27%, C 20.59% and D 1.96%; in addition, 133 variations in the mitochondrial genome and 123 methylation sites in the D-loop region were identified. Carrying out a statistical analysis, it was determined that haplogroup A2 is a risk factor for CaMa (OR = 2.12,  $p = 0.003$ ), while subhaplogroup B4 is a protection factor (OR = 0.063;  $p = 0.0001$ ), the variant T16189C was associated as a protection factor (OR = 0.38,  $p = 0.0004$ ). To identify the epigenetic profile of the samples, a new approach was developed called RT-PCR bisulfite sequencing that allowed us to identify the profile of 42 samples, the statistical analysis performed on the undiluted methylation profiles, some association between the epigenetic profile of mtDNA and breast cancer.



### **Resumen.**

El cáncer es un término que designa un grupo de enfermedades, que pueden afectar cualquier parte del organismo, se caracteriza por el crecimiento descontrolado de células anormales en el cuerpo. Actualmente, el cáncer de mama es una prioridad en salud pública a nivel mundial y en México al ser la neoplasia más frecuente en mujeres. Se ha demostrado, que variantes en el genoma mitocondrial confieren riesgo, y se relacionan con el origen étnico de la población siendo estas variaciones más frecuentes en la región D-loop. En las últimas décadas, se ha encontrado evidencia creciente de que algunos haplogrupos mitocondriales pueden actuar como factor de riesgo y/o protección en cáncer; y la epigenética mitocondrial ha sido asociada con la severidad de enfermedades como: hígado graso no alcohólico, diabetes o Alzheimer. En el presente trabajo se determinó el haplogrupo mitocondrial, mediante PCR tiempo real y secuenciación de la región D-loop de 210 muestras de pacientes mexicanas diagnosticadas con cáncer de mama. Se observó que los haplogrupos amerindios representaron: A un 61.76%, B un 11.27%, C un 20.59% y D un 1.96% de las muestras; se identificaron 133 variaciones en el genoma mitocondrial y 123 sitios de metilación en la región D-loop. A través de un análisis estadístico se determinó que el haplogrupo A es un factor de riesgo a CaMa en particular el subhaplogrupo A2 (OR= 2.12,  $p=0.003$ ), mientras que el subhaplogrupo B4 es un factor de protección (OR= 0.063;  $p=0.0001$ ), la variante T16189C, se asoció como un factor de protección (OR= 0.38,  $p=0.0004$ ). Para identificar el perfil epigenético de las muestras se desarrollamos una nueva aproximación denominada “RT-PCR bisulfite sequencing”, que nos permitió identificar el perfil de metilación de 42 muestras, el análisis estadístico realizado, no dilucido alguna asociación entre el perfil epigenético del mtDNA y cáncer de mama.



## I Introducción.

### 1.1. Cáncer.

El cáncer, son un conjunto de enfermedades caracterizadas por un proceso descontrolado en la división celular, puede iniciarse en cualquier lugar del cuerpo humano. Usualmente, las células crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita, cuando las células normales envejecen o se dañan, mueren, y células nuevas las remplazan. En el cáncer, este proceso es desordenado y sin control. A medida que las células se hacen anormales, las células viejas o dañadas evitan la muerte celular programada. Estas células pueden dividirse sin interrupción y formar masas denominadas tumores [1].

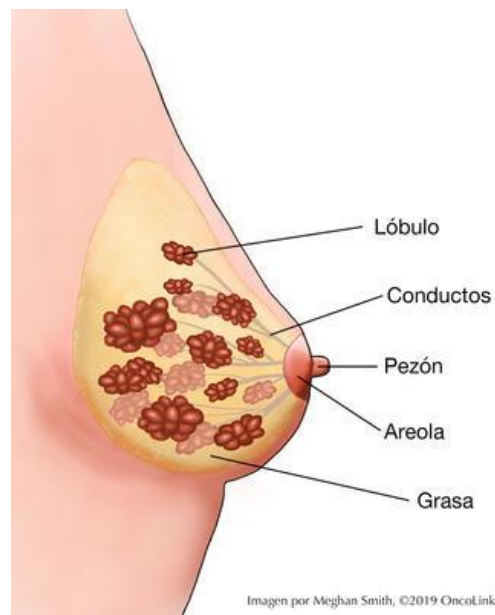
Los tumores se pueden extender a los tejidos cercanos. Al crecer estos tumores, las células pueden desprenderse y moverse a lugares distantes del cuerpo, a través del sistema circulatorio o del sistema linfático, e invadir otros tejidos, lo que se conoce como metástasis. Muchos cánceres, como el de mama, forman tumores sólidos. [2].

Se conocen alrededor de 200 tipos de cáncer. Para el año 2018 a nivel mundial se registraron 18,078,957 de casos nuevos, siendo el cáncer de pulmón (11.6%), mama (11.6%), colorrectal (10.2%), próstata (7.1%) y estomago (5.7%), los de mayor incidencia a nivel mundial para ambos sexos. De éstos, 8,622,539 casos se detectaron en mujeres, siendo el cáncer de mama (CaMa) el de mayor incidencia con un 24.2%, seguido de colorrectal (9.5%), pulmón (8.4%), cérvico uterino (6.6%) y tiroides (5.1%) [3, 4]. Entender la biología del desarrollo del cáncer, nos permitirá aportar conocimiento para el diagnóstico.



## 1.2 Cáncer de mama.

A nivel mundial en 2018, se registraron 2,088,849 casos nuevos de CaMa, ocupando el segundo lugar de casos registrados, solo superado por el cáncer de pulmón [3, 4]. Esta patología inicia con el crecimiento anormal de las células de la glándula mamaria (Figura 1), principalmente a partir de células epiteliales de los ductos mamarios. El CaMa puede desarrollarse debido a diferentes factores; como mutaciones en genes supresores de tumor o protooncogenes; exposición a agentes carcinogénicos (radiación, químicos, etc); un estilo de vida sedentario exposición a hormonas sexuales. Las mutaciones que se han asociado a la presencia de CaMa pueden ser adquiridas durante la vida del individuo y catalogarse como una enfermedad esporádica, o pueden ser transmitidas de generación en generación y catalogadas como enfermedad familiar o hereditaria [5].



**Figura 1.** Anatomía e histología de la glándula mamaria. Se observa los elementos de la glándula mamaria: lóbulos, conductos, areola, pezón.

### 1.2.1 Clasificación del cáncer de mama.

El cáncer de mama se puede presentar en diferentes áreas del seno, como los conductos, los lobulillos o el tejido intermedio. El tipo de CaMa está determinado por las células afectadas. Según el origen celular, el CaMa pueden dividirse en



carcinomas y sarcomas. Los carcinomas son cáncer que surgen del componente epitelial del seno. Los sarcomas son una forma mucho más rara de cáncer de mama (<1% del cáncer de mama primario) que surge de los componentes del estroma de la mama [6, 7].

La mayoría de los cánceres de mama, son carcinomas. Poder distinguir con precisión entre los distintos subtipos es vital, ya que cada uno tiene diferentes pronósticos e implicaciones en el tratamiento. Según los criterios de características patológicas e invasividad, los cánceres de mama comunes se pueden dividir en tres grupos principales: no invasivos (o *in situ*), cáncer de mama invasivos y metastásicos [7, 8].

Dentro de los diferentes tipos de cáncer, el carcinoma ductal invasivo (CDI) representa aproximadamente el 80%, mientras que el carcinoma lobular invasivo (CLI) representa entre el 10-15%. Entre el CDI y el CLI representan entre el 90-95%, el resto de los casos los representa el carcinoma ductal in situ (CDIS), carcinoma infiltrante de mama (CIM), cáncer de mama inflamatorio (CMI), carcinoma papilar o angiosarcoma de mama [9]. Para una clasificación clínica del CaMa se usa el sistema TNM (T= Tumor primario; N= Ganglios linfáticos regionales; M= Metástasis), donde T se refiere a el tamaño del diámetro en milímetros (mm) del tumor; N se refiere a los ganglios del sistema linfático que tienen presencia de células cancerosas; y M se refiere a la metástasis que pueden presentar. Este sistema proporciona información sobre el pronóstico, orienta al personal de salud sobre el tratamiento a seguir y en la actualidad también se usa como complemento para evaluar el tamaño del tumor, la presencia de células cancerosas en los ganglios y el grado de metástasis. En la Tabla 1 se puede observar la clasificación del sistema TNM para el cáncer de mama de manera detallada.





Tabla 1. Clasificación del sistema TNM para CaMa.

<b>Tumor primario</b>	
<b>Tx</b>	Tumor primario que no puede ser evaluado.
<b>T0</b>	No hay evidencia de tumor primario.
<b>Tis</b>	CDIS Carcinoma ductal <i>in situ</i> , CLIS Carcinoma lobulillar <i>in situ</i> , enfermedad de paget del pezón.
<b>T1</b>	Tumor $\leq 20$ mm
<b>T1mi</b>	Tumor $\geq 1$ mm en su diámetro mayor
<b>T1a</b>	Tumor $> 1 \leq 5$ mm en su diámetro mayor
<b>T1b</b>	Tumor $> 10 \leq 20$ mm en su diámetro mayor
<b>T1c</b>	Tumor $> 20 \leq 50$ mm en su diámetro mayor
<b>T2</b>	Tumor $> 50$ mm de diámetro
<b>T3</b>	Tumor $> 50$ mm de diámetro
<b>T4</b>	Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica y/o la dermis
<b>T4a</b>	Extensión a la pared torácica.
<b>T4b</b>	Ulceración y/o nódulos y/o edema de la piel, que no cumple con un carcinoma inflamatorio.
<b>T4c</b>	T4a y T4b combinado.
<b>T4d</b>	Carcinoma inflamatorio.
<b>Ganglios</b>	
<b>Nx</b>	Los ganglios regionales no pueden ser evaluados.
<b>N0</b>	No hay metástasis en los ganglios regionales.
<b>N1</b>	Metástasis móviles en ganglios ipsilaterales, del nivel I o II axilar.
<b>N2</b>	Ganglios positivos en la cadena mamaria interna, en ausencia de ganglios axilares clínicamente palpables.
<b>N2a</b>	Metástasis en ganglios axilares del nivel I o II, fijos entre ellos.
<b>N2b</b>	Metástasis de los ganglios de la cadena mamaria interna en ausencia de ganglios axilares.
<b>N3</b>	Metástasis a ganglios infraclaviculares (nivel III) ipsilaterales con o sin ganglios nivel I o II. Ganglios de la cadena mamaria interna con afección de los ganglios nivel I o II axilar.
<b>N3a</b>	Metástasis a los ganglios infraclaviculares ipsilaterales.
<b>N3b</b>	Metástasis a ganglios ipsilaterales de la cadena mamaria interna.
<b>N3c</b>	Metástasis a ganglios supraclaviculares ipsilaterales.
<b>Metástasis</b>	
<b>M0</b>	No hay evidencia clínica o radiológica de metástasis a distancia
<b>cM0(i+)</b>	No hay evidencia clínica o radiológica de metástasis a distancia, pero existen depósitos moleculares o microscópicos detectados por células tumorales en la sangre.
<b>M1</b>	Metástasis a distancia detectable



### 1.2.1.1 Clasificación molecular del cáncer de mama.

El CaMa se clasifica de varios subtipos biológicos, que tienen comportamientos y respuestas distintas a la terapia. Con el avance de las técnicas de perfiles de expresión génica, la lista de genes intrínsecos que diferencian estos subtipos, ahora está compuesta por varios grupos de genes relacionados con la expresión del receptor de estrógeno (ER), la expresión del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), proliferación y un grupo único de genes (llamado grupo basal) que se divide en cinco subtipos moleculares de acuerdo con el patrón de expresión de los ER, receptor de progesterona (PR) y Her2 [9, 10].

Luminal A, este subtipo tiene ER y/o receptor de progesterona (PR) positivo, HER2 negativo y bajos niveles de Ki-67. El cáncer Luminal A representa el 40% del CaMa. Son de bajo grado, de crecimiento lento y tienden a tener el mejor pronóstico. El tratamiento generalmente involucra terapia hormonal [11]. Luminal B, representando <20% de todos los CaMa, este subtipo es positivo para ER y/o PR, ya sea positivo o negativo a HER2 y presenta altos niveles de Ki-67. El cáncer Luminal B crece más rápido que los Luminales A y su pronóstico es más agresivo [9].

El subtipo HER2 constituye entre el 10-15% de los CaMa y se caracteriza por la ausencia de expresión de ER y PR; y una alta expresión de los grupos de genes HER2. Los cánceres HER2 crecen más rápido que los cánceres luminales y tienen un pronóstico más agresivo [8]. El CaMa triple negativo (CMTN) representa el 20%, se caracteriza por ER-negativo, PR-negativo y HER2-negativo. El CMTN es común en mujeres con mutaciones genéticas en *BRCA1*, así como entre mujeres menores de 40 años y mujeres afroamericanas. Este subtipo generalmente se comporta de manera más agresiva que otros tipos CaMa, lo que lo convierte en el más agresivo. El CaMa basal, es un subtipo similar a la enfermedad luminal A. Es ER y/o PR-positivo, HER2 negativo y tiene niveles bajos de la proteína Ki-67. Si bien este subtipo es de aspecto normal tiene un buen pronóstico, solo un poco más agresivo que el luminal A [7, 9, 11].



Para la estadificación clínica y tasas de supervivencia del CaMa, una vez que se diagnostica el cáncer, se realizan pruebas para determinar el estadio de la enfermedad, lo que afectará el tratamiento que reciben las pacientes. La estadificación clínica es idéntica en todos los subtipos de CaMa de acuerdo con el American Joint Committee on Cancer (AJCC) y el sistema de estadificación de CaMa, tumor y nodo de la Unión Internacional para el Control del Cáncer (UICC): Etapa 0, Etapa I, Etapa II, Etapa III y Etapa IV, como se detalla en Tabla 2.

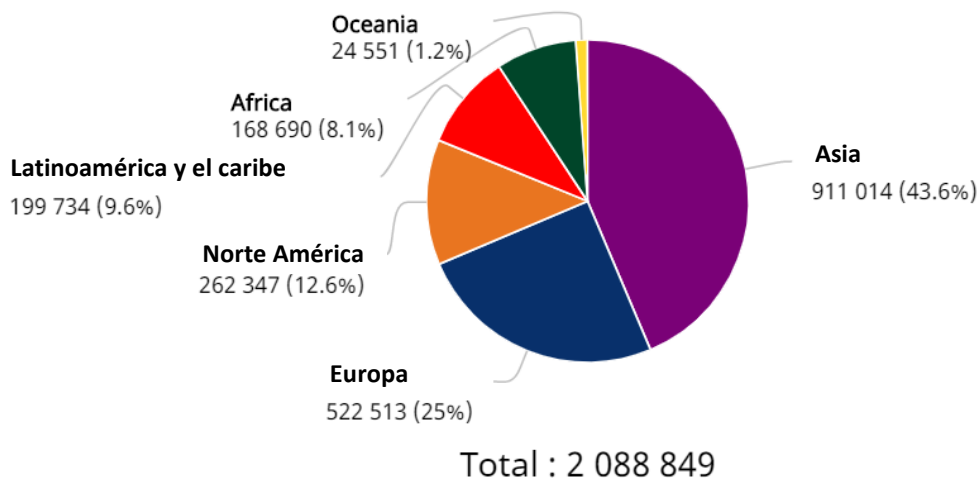
**Tabla 2.** Grado de estadio anatómico del CaMa.

<i>Etapa</i>	<i>Definición</i>
<i>Etapa 0</i>	Carcinoma Ductal <i>in Situ</i>
<i>Etapa I</i>	IA Tumor invasivo primario con un tamaño de $\leq 20$ mm Sin afectación ganglionar.
	IB Micrometástasis ganglionares ( $>0.2$ mm, $<2.0$ mm) con o sin tumor primario de $\leq 20$ mm.
<i>Etapa II</i>	IIA Metástasis ganglionares ipsilaterales móviles de nivel I, II con tumor primario de $\leq 20$ mm; O $>20$ mm, tumor de $\leq 50$ mm sin afectación ganglionar.
	IIB Metástasis ganglionares ipsilaterales móviles de nivel I, II con tumor $>20$ mm, $\leq 50$ mm; o tumor $>50$ mm sin afectación ganglionar.
<i>Etapa III</i>	IIIA Metástasis ganglionares ipsilaterales móviles de nivel I, II con tumor $>50$ mm; O tumor primario de cualquier tamaño con metástasis ipsilaterales fijas de nivel I, II o ganglios linfáticos internos.
	IIIB Tumor primario con invasión de la pared torácica y/o de la piel.
	IIIC Tumor primario de cualquier tamaño con metástasis ganglionares supraclaviculares o ipsilaterales de nivel III; O con metástasis ipsilaterales de nivel I, II y ganglios linfáticos internos.
<i>Etapa IV</i>	Cualquier caso con metástasis a órganos distantes.



## 1.2.2 Epidemiología del cáncer mamario.

En el mundo, uno de los tipos de cáncer más común en las mujeres es el de mama. Se estima que una de cada 13 mujeres se ve afectada a lo largo de su vida por esta enfermedad; en 2018 se diagnosticaron 2,088,849 casos nuevos y 626,679 defunciones asociadas a CaMa a nivel mundial [4, 11]. La incidencia del CaMa es diferentes entre regiones; por ejemplo Asia represento un 43.6% de los casos nuevos registrados en 2018, seguido de Europa con un 25%, Norte América (Estados Unidos y Canadá) 12.6%, Latinoamérica y el Caribe un 9.6%, África un 8.1% y Oceanía con un 1.2%. (Figura 2), por país China representa el primer lugar con un 17.6% de los casos nuevos de CaMa reportdos en 2018, seguido de Estados Unidos con un 11.2%, India con 7.2%, Brasil con 4.1% y Alemania con 3.4%, México representó un 1.29% de los casos en 2018[4] (Figura 3).

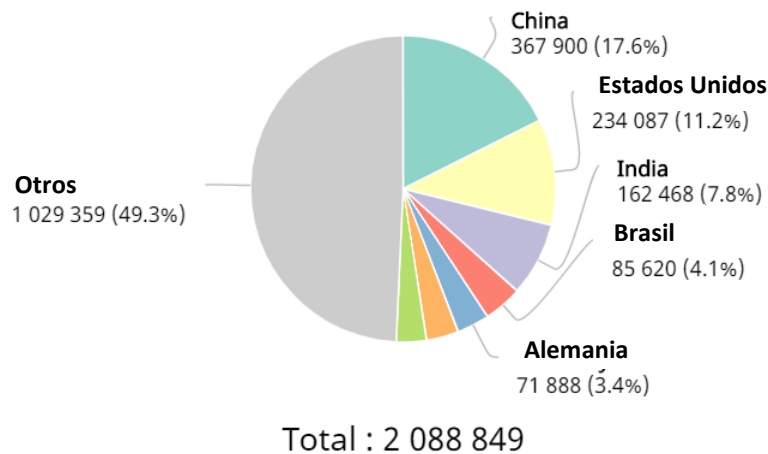


**Figura 2.** Gráfica de número de casos nuevos de CaMa diagnosticados en las diferentes regiones de la OMS en 2018.

En México, durante las últimas décadas la morbilidad del CaMa en las mujeres se ha incrementado notablemente: ocupa el primer lugar (17%), después del cáncer cervicouterino (36 %). Para el 2018 en México se registraron 27,283 nuevos casos de CaMa, con 6,884 decesos. El grupo de edad con mayor número de defunciones fue el de 45 a 54 años; seguido del de 35 a 44 años. Las mayores tasas de mortalidad se presentaron en: Baja California Sur (19.5 por 100 mil



mujeres), Coahuila, Chihuahua y Ciudad de México (tasa similar de 14.4 por 100 mil mujeres). En México, la magnitud del problema se puede explicar cuando se estima p que para el año 2040 el número de casos nuevos se incremente a 46,315 casos, además de que .la población de mujeres de 25 años o más (edad de riesgo para presentar cáncer de mama) alcanzará los 35.7 millones; que el porcentaje de mujeres en quienes se hace el diagnóstico oportuno no supera 10% y la capacidad de los servicios de detección oportuna de cáncer mamario no sobrepasa 55% [12, 13].



**Figura 3.** Gráfica de incidencia de CaMa por país. Fuente de datos Globocan 2018 [4].

### 1.2.3 Biología del CaMa.

El CaMa es una enfermedad muy compleja, su desarrollo se asocia a diferentes factores de riesgo, tanto ambientales, como sobrepeso, tabaquismo, estilo de vida, así como genéticos que ocasionan la acumulación de alteraciones, que pueden desembocar en una desregulación en proliferación o apoptosis de la célula, que ocasionan que las células normales cambien hacia células cancerosas. Un factor de riesgo se define como cualquier evento que contribuya con la posibilidad de una persona de contraer CaMa, por ejemplo, el hecho de ser mujer es un factor de riesgo, es aproximadamente 100 veces más probable el CaMa en mujeres que en hombres. El envejecimiento, inevitablemente aumenta el riesgo, como lo demuestra el hecho de que la mayoría de los casos de CaMa se



diagnostican en mujeres de 50 años o mayores. Se ha reportado que el riesgo de una mujer, se duplica si tiene un pariente de primer grado (madre, hermana o hija) diagnosticada con CaMa [11, 14].

Alrededor de entre 5-10% de los casos de CaMa están relacionados con mutaciones genéticas heredadas de alguno de los padres. El CaMa hereditario se relaciona con mutaciones en los genes *BRCA1* y/o *BRCA2*. Estadísticamente, las mujeres con una mutación en *BRCA1* tienen de un 55-65% más posibilidades de desarrollar CaMa. Para las mujeres con una mutación en *BRCA2*, el riesgo es del 45%. Aunque son menos comunes y drásticos en su aumento del riesgo a CaMa que las mutaciones *BRCA1*, otros genes también pueden conducir al desarrollo, tal como: *ATM*, *TP53* (las mutaciones heredadas de este gen causan un mayor riesgo de desarrollar CaMa, así como leucemia, tumores cerebrales y sarcomas), *CHEK2*, *PTEN*, *CDH1* o *PALB2* [2, 7, 9, 10, 15].

Además de los factores genéticos hay otros factores que se han asociado al desarrollo del CaMa como:

- i) **Antecedentes familiares.** Tener algún antecedente familiar de primer grado (madre, hermana, hija) con CaMa puede llegar a duplicar o triplicar el riesgo de desarrollarlo de este padecimiento, el riesgo en los parientes más alejados se incrementa sólo ligeramente. Cuando a dos a más familiares de primer grado se ha determinado CaMa, el riesgo puede ser 5 o 6 veces mayor. También, si se tienen varios familiares que han padecido CaMa u ovario (antes de los 50 años), podrían tener un mayor riesgo de desarrollar esta neoplasia [2, 9].
- ii) **Grupos poblacionales o etnia.** En general, las mujeres caucásicas son ligeramente más propensas a desarrollar CaMa que las mujeres afrodescendientes, aunque el cáncer de mama es más común en mujeres afrodescendientes menores de 45 años. Las mujeres afrodescendientes tienen más probabilidades de morir de cáncer de mama a cualquier edad. Otras como las mujeres asiáticas, hispanas o



nativas americanas, tienen un menor riesgo de desarrollar y morir de cáncer de mama [7, 10, 15].

- iii) **Anticonceptivos.** Muchos métodos anticonceptivos usan hormonas, lo que puede aumentar el riesgo de cáncer de mama. Las mujeres que usan anticonceptivos orales tienen un riesgo ligeramente mayor de cáncer de mama que las mujeres que nunca los han usado, aunque el riesgo parece volver a la normalidad con el tiempo [7, 9]
- iv) **Terapia de reemplazo hormonal (TRH).** La terapia hormonal combinada posmenopáusica aumenta el riesgo de CaMa, la posibilidad de morir por CaMa y la probabilidad de que el cáncer se encuentre en una etapa más avanzada. La decisión de someterse a el tratamiento de TRH debe ser tomada por una mujer y su médico, después de sopesar los posibles riesgos y beneficios, considerando otros factores de riesgo como enfermedad cardíaca, cáncer de mama u osteoporosis [2, 9, 10].
- v) **Consumo excesivo de alcohol.** Beber alcohol está claramente relacionado con un mayor riesgo de CaMa y el aumento del riesgo causado por este factor se correlaciona con la cantidad de alcohol consumido. Por ejemplo, las mujeres que toman de dos a tres bebidas al día tienen aproximadamente un 20% más de riesgo de CaMa, en comparación con las mujeres que no beban alcohol [2, 9].
- vi) **Sobrepeso u obesidad significativos.** Tener más tejido graso después de la menopausia aumentará los niveles de estrógeno y aumentará el riesgo de CaMa. El sobrepeso tiende a conducir a niveles más altos de insulina en la sangre, y los niveles más altos de insulina están relacionados con ciertos tipos de cáncer, incluido el de mama [9].
- vii) **Embarazo y amamantar.** Las mujeres que no han tenido hijos o que tienen su primer hijo después de los 30 años tienen un riesgo mayor a CaMa. Por el contrario, tener embarazos múltiples y/o quedar



embarazada a una edad temprana reduce el riesgo. Se ha sugerido que la lactancia materna puede reducir ligeramente el riesgo, especialmente si el periodo de lactancia durante entre 1,5 y 2 años [10, 16, 17].

- viii) **Inicio de la menstruación y menopausia.** Las mujeres tendrán más ciclos menstruales si comienzan a menstruar temprano, especialmente antes de los 12 años, y por lo tanto tendrán una mayor exposición en la vida a las hormonas estrógeno y progesterona, lo que aumenta el riesgo. De manera similar, las mujeres tendrán más ciclos menstruales si pasan por la menopausia más tarde, especialmente después de los 55 años [10, 16, 17].

Inicialmente la investigación sobre la biología del cáncer se centró en las alteraciones genéticas nucleares como; mutaciones, deleciones o inserciones en genes como *BCRA1* y *BCRA2* entre otros, que pudieran explicar las desregulaciones en la expresión genética. Pero, estas alteraciones genéticas no estaban presentes en todos los pacientes con esta patología [18, 19]. Sin embargo, en años recientes se observó que no solo el DNA nuclear influye en el desarrollo del CaMa, sino que también el DNA mitocondria (mtDNA) pueden afectar y favorecer el desarrollo de CaMa. Se sabe que ciertas mutaciones en el mtDNA, por ejemplo T3197C [20] o G9055A [21] favorecen la invasividad, la progresión, el mantenimiento o la inestabilidad genómica en una célula cancerosa, sin embargo la contribución de la mitocondria en el desarrollo, mantenimiento o progresión del cáncer no es clara y se sigue investigando hasta el momento [19, 22].

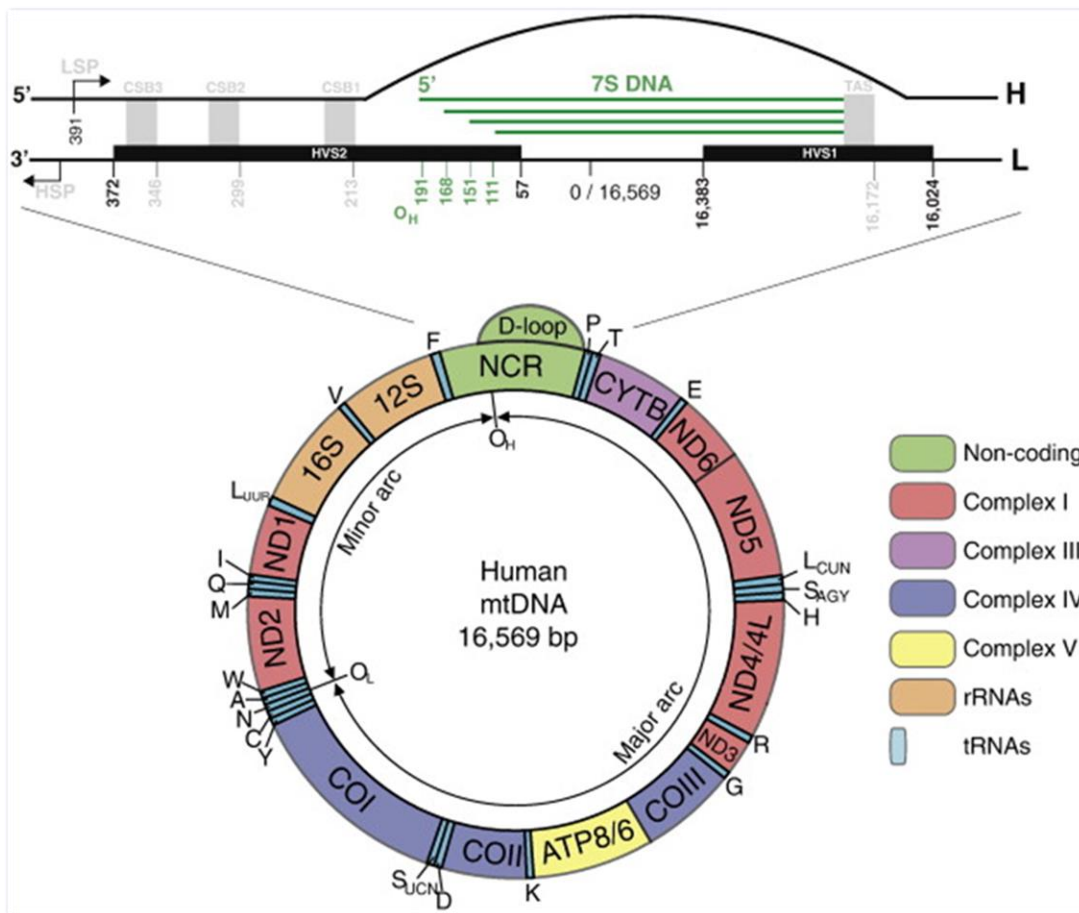
### **1.3. Mitocondria y DNA mitocondrial.**

La mitocondria es un organelo intracelular de doble membrana, tiene su propio DNA y su función es la de producir la energía que la célula requiere. Su función puede estar afectada en diversas enfermedades como: la diabetes, el cáncer o las neurodegenerativas [23]. El genoma de la mitocondria consiste de una doble cadena de DNA circular de 16,569 pb en humanos. El mtDNA representa





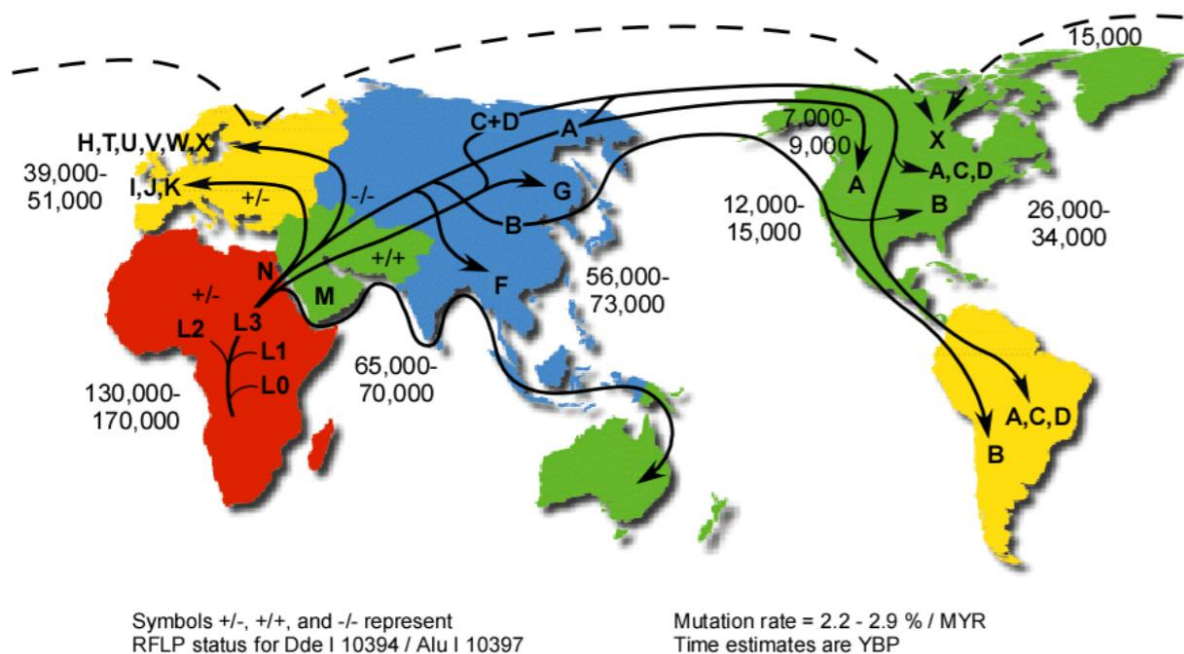
entre 0.5 a 20% del DNA total, dependiendo el tipo de célula, tiene codificada la información de 37 genes y una zona de control no codificante denominada región D-loop. De estos 37 genes que contiene el mtDNA, dos codifican para el RNA ribosomal (rRNA; 12S rRNA y 16S rRNA), 22 RNA para el RNA de transferencia (tRNA) y trece genes para proteínas (ND1-6 cyt b, COI-III, ATPasa6 y 8), que forman parte de cuatro, de los cinco complejos enzimáticos del sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS; Figura 4) [24].



**Figura 4.** Genoma mitocondrial humano. El mtDNA incluye la región no codificante D-loop, el cual está involucrado en la regulación de la transcripción y replicación del DNA. La región codificante comprende; 7 subunidades del complejo I, 1 subunidad del complejo III, 3 del complejo IV y 2 del complejo V de la OXPHOS. Los genes que codifican para las subunidades 12S y 16S del rRNA. OH y OL indican los orígenes de replicación de las cadenas pesada y ligera, respetivamente. HSP; promotor de la cadena pesada, LSP; promotor de la cadena ligera, TFAM; factor de transcripción A mitocondrial, POLRM; RNA polimerasa mitocondrial, MTERF; factor de terminación mitocondrial, HVR 1 y 2; regiones hipervariables 1 y 2, CSB 1, 2 y 3; bloques de secuencias conservadas Tomado de Nicholls et al, [25].



Una de las particularidades de mtDNA, es que no recombina durante su división o replicación, en comparación con el DNA nuclear, lo que permite la acumulación en forma cronológica de variaciones, que son heredadas a la descendencia. El mtDNA se hereda única y exclusivamente vía materna, esta característica permite la formación de haplogrupos mitocondriales (Hg) que se formaron a través del tiempo. Los Hg se formaron en África hace aproximadamente entre 130-170 mil años a partir de L0 del cual surgieron el resto de los Hg. Actualmente se conocen tres Hg africanos denominados L1, L2 y L3, de los cuales surgieron los macrohaplogrupos N y M, estos dieron origen a nueve Hg europeos los cuales son H, I, J, K, T, U, V, W y X y siete Hg asiáticos que son A, B, C, D, E, F y G. En el continente americano es un caso especial, aproximadamente hace 34,000 años se importaron los Hg A, B, C y D, a los cuales se la conoce como Hg fundadores o amerindios ya que fueron los primeros en ser introducidos al continente, sin embargo también se han detectado los Hg H, U y X, (Figura 5) [26].



**Figura 5.** Origen y migración de los haplogrupos mitocondriales en el mundo. Tomado de <https://www.mitomap.org/foswiki/pub/MITOMAP>.



#### **1.4 Cáncer y mtDNA.**

El primer reporte de asociación entre una mutación de mtDNA y el cáncer fue por Petros *et al*, [27] quienes identificaron la mutación T8993G en el gen ATP6 en un paciente con cáncer de próstata, demostrando su capacidad tumorigénica en un modelo de cáncer de próstata de ratón desnudo. Las variantes del mtDNA comúnmente observadas, son polimorfismos o mutaciones de la línea germinal, mutaciones somáticas (células cancerosas), mutaciones puntuales, repeticiones mono o dinucleótido, inserciones, deleciones y variaciones en el número de copias del mtDNA [12, 27, 28]. Las variantes mtDNA más comunes que se han asociado con un mayor riesgo de cáncer son: T16189C (D-Loop), G10398A (A114T en el gen ND3) y la deleción  $\Delta$ mtDNA4977. En la Figura 6 se puede observar las variantes en el mtDNA que se han asociado a algún tipo de cáncer tanto en región codificante como no codificante (Figura 6) [12, 27-29].

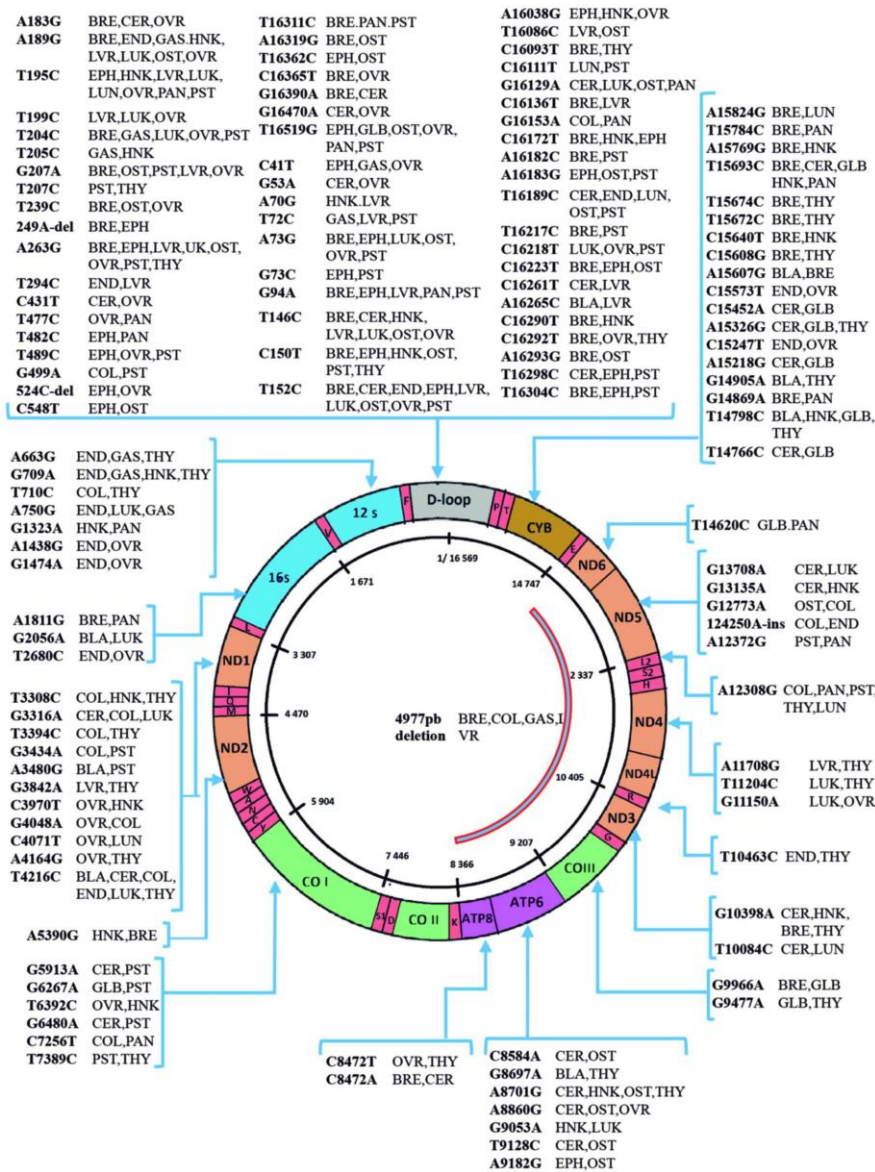
Los Hg pueden actuar como factor de riesgo o protección dependiendo de la población analizada. Se han asociado Hg con el desarrollo de algunos tipos de cáncer como próstata, mama, etc; se conoce la sobrerrepresentación del Hg I en pacientes con cáncer de próstata y mama en polacos [30]; el Hg U está asociado con un mayor riesgo de desarrollar cáncer renal y de próstata en pacientes polacos [31]; y los Hg JT, H, N y L con el riesgo de desarrollar cáncer de páncreas, mientras que el Hg K se ha identificado como protector para este tipo de cáncer en población caucásica en Estados Unidos [32]. En China, se han asociado los Hg D4a y D5a, con un mayor riesgo de cáncer de esófago; mientras que los Hg N y M son utilizados como biomarcadores para la buena y mala supervivencia de los pacientes con cáncer gástrico, respectivamente [33]. En población japonesa se reportó que el Hg M7b2 incrementa el riesgo para desarrollar cáncer hematológico [32].

#### **1.5 Cáncer de mama y mtDNA.**

El papel que tienen las variantes del mtDNA en el desarrollo, metástasis o resistencia al tratamiento de CaMa u otros tipos de cancer se han investigado en las últimas décadas. La región D-loop, especialmente en las HVR1 y HVR2,



concentran el mayor número de variables reportadas asociadas con riesgo o protección. Se conoce que la región D-loop es 60 veces más susceptible a variaciones, que la región codificante del mtDNA [34, 35].



**Figura 6.** Variantes del mtDNA asociadas a diferentes tipos de cáncer. Se observa el diagrama del mtDNA, la localización de los genes mitocondriales y su región no codificante, así como las variantes del mtDNA asociadas a cáncer humano. **BLA**, cáncer de vejiga; **BRE**, cáncer de mama; **CER**, cáncer cervical; **COL**, cáncer de colon; **END**, cáncer de endometrio; **EPH**, cáncer de esófago; **GAS**, cáncer gástrico; **GLB**, glioblastoma; **HNK**, cáncer de cabeza y cuello; **LUK**, leucemia; **LVR**, cáncer de hígado; **LUN**, cáncer de pulmón; **OTS**, osteosarcoma; **OVR**, cáncer de ovario; **PNC**, cáncer pancreático; **PST**, cáncer de próstata; **THY**, cáncer de tiroides. Tomada de Jiménez-Morales et al [29].



**Tabla 3.**

<b>Tabla 4.</b>	<b>Tabla 5.</b>	<b>Tabla 6.</b>	<b>Tabla 7.</b>
<b>Tabla 8.</b>	<b>Tabla 9.</b>	<b>Tabla 10.</b>	<b>Tabla 11.</b>
<b>Tabla 12.</b>	<b>Tabla 13.</b>	<b>Tabla 14.</b>	<b>Tabla 15.</b>
<b>Tabla 16.</b>	<b>Tabla 17.</b>	<b>Tabla 18.</b>	<b>Tabla 19.</b>
<b>Tabla 20.</b>	<b>Tabla 21.</b>	<b>Tabla 22.</b>	<b>Tabla 23.</b>
<b>Tabla 24.</b>	<b>Tabla 25.</b>	<b>Tabla 26.</b>	<b>Tabla 27.</b>
<b>Tabla 28.</b>	<b>Tabla 29.</b>	<b>Tabla 30.</b>	<b>Tabla 31.</b>
<b>Tabla 32.</b>	<b>Tabla 33.</b>	<b>Tabla 34.</b>	<b>Tabla 35.</b>
<b>Tabla 36.</b>	<b>Tabla 37.</b>	<b>Tabla 38.</b>	<b>Tabla 39.</b>
<b>Tabla 40.</b>	<b>Tabla 41.</b>	<b>Tabla 42.</b>	<b>Tabla 43.</b>
<b>Tabla 44.</b>	<b>Tabla 45.</b>	<b>Tabla 46.</b>	<b>Tabla 47.</b>
<b>Tabla 48.</b>	<b>Tabla 49.</b>	<b>Tabla 50.</b>	<b>Tabla 51.</b>
<b>Tabla 52.</b>	<b>Tabla 53.</b>	<b>Tabla 54.</b>	<b>Tabla 55.</b>
<b>Tabla 56.</b>	<b>Tabla 57.</b>	<b>Tabla 58.</b>	<b>Tabla 59.</b>
<b>Tabla 60.</b>	<b>Tabla 61.</b>	<b>Tabla 62.</b>	<b>Tabla 63.</b>
<b>Tabla 64.</b>	<b>Tabla 65.</b>	<b>Tabla 66.</b>	<b>Tabla 67.</b>
<b>Tabla 68.</b>	<b>Tabla 69.</b>	<b>Tabla 70.</b>	<b>Tabla 71.</b>
<b>Tabla 72.</b>	<b>Tabla 73.</b>	<b>Tabla 74.</b>	<b>Tabla 75.</b>
<b>Tabla 76.</b>	<b>Tabla 77.</b>	<b>Tabla 78.</b>	<b>Tabla 79.</b>
<b>Tabla 80.</b>	<b>Tabla 81.</b>	<b>Tabla 82.</b>	<b>Tabla 83.</b>
<b>Tabla 84.</b>	<b>Tabla 85.</b>	<b>Tabla 86.</b>	<b>Tabla 87.</b>
<b>Tabla 88.</b>	<b>Tabla 89.</b>	<b>Tabla 90.</b>	<b>Tabla 91.</b>
<b>Tabla 92.</b>	<b>Tabla 93.</b>	<b>Tabla 94.</b>	<b>Tabla 95.</b>
<b>Tabla 96.</b>	<b>Tabla 97.</b>	<b>Tabla 98.</b>	<b>Tabla 99.</b>
<b>Tabla 100.</b>	<b>Tabla 101.</b>	<b>Tabla 102.</b>	<b>Tabla 103.</b>
<b>Tabla 104.</b>	<b>Tabla 105.</b>	<b>Tabla 106.</b>	<b>Tabla 107.</b>
<b>Tabla 108.</b>	<b>Tabla 109.</b>	<b>Tabla 110.</b>	<b>Tabla 111.</b>
<b>Tabla 112.</b>	<b>Tabla 113.</b>	<b>Tabla 114.</b>	<b>Tabla 115.</b>
<b>Tabla 116.</b>	<b>Tabla 117.</b>	<b>Tabla 118.</b>	<b>Tabla 119.</b>
<b>Tabla 120.</b>	<b>Tabla 121.</b>	<b>Tabla 122.</b>	<b>Tabla 123.</b>



Tabla 124.	Tabla 125.	Tabla 126.	Tabla 127.
Tabla 128.	Tabla 129.	Tabla 130.	Tabla 131.
Tabla 132.	Tabla 133.	Tabla 134.	Tabla 135.
Tabla 136.	Tabla 137.	Tabla 138.	Tabla 139.
Tabla 140.	Tabla 141.	Tabla 142.	Tabla 143.
Tabla 144.	Tabla 145.	Tabla 146.	Tabla 147.
Tabla 148.	Tabla 149.	Tabla 150.	Tabla 151.
Tabla 152.	Tabla 153.	Tabla 154.	Tabla 155.
Tabla 156.	Tabla 157.	Tabla 158.	Tabla 159.
Tabla 160.	Tabla 161.	Tabla 162.	Tabla 163.
Tabla 164.	Tabla 165.	Tabla 166.	Tabla 167.
Tabla 168.	Tabla 169.	Tabla 170.	Tabla 171.
Tabla 172.	Tabla 173.	Tabla 174.	Tabla 175.
Tabla 176.	Tabla 177.	Tabla 178.	Tabla 179.
Tabla 180.	Tabla 181.	Tabla 182.	Tabla 183.
Tabla 184.	Tabla 185.	Tabla 186.	Tabla 187.
Tabla 188.	Tabla 189.	Tabla 190.	Tabla 191.
Tabla 192.	Tabla 193.	Tabla 194.	Tabla 195.
Tabla 196.	Tabla 197.	Tabla 198.	Tabla 199.
Tabla 200.	Tabla 201.	Tabla 202.	Tabla 203.
Tabla 204.	Tabla 205.	Tabla 206.	Tabla 207.
Tabla 208.	Tabla 209.	Tabla 210.	Tabla 211.
Tabla 212.	Tabla 213.	Tabla 214.	Tabla 215.
Tabla 216.	Tabla 217.	Tabla 218.	Tabla 219.
Tabla 220.	Tabla 221.	Tabla 222.	Tabla 223.
Tabla 224.	Tabla 225.	Tabla 226.	Tabla 227.

Tabla 228.

<b><i>Población</i></b>	<b><i>Variante</i></b>	<b><i>Gen</i></b>	<b><i>Referencias</i></b>
<i>Africo-americana</i>	G10398a	<i>ND3</i>	Carter <i>et al</i> , [21]
<i>Canadiense</i>	310-ins	D-loop	Xu <i>et al</i> , [36]
<i>China</i>	2463-del	<i>RNR2</i>	Fang <i>et al</i> , [37]; Wang <i>et al</i> , [38]; Li <i>et al</i> , [39].
	C6296T	<i>COI</i>	



	6298-del	<i>COI</i>	
	8460-13477 del	<i>ATP8, ATP6, CO3, TG, ND3, TR, ND4L, ND4, TH, TS2, TL2, ND5</i>	
	A8860	<i>ATP6</i>	
	A10397G	<i>ND3</i>	
	G103998A	<i>ND3</i>	
	13237A-del	<i>ND5</i>	
	T16189C	D-loop	
<i>Europea-americana</i>	T3197C	<i>RNR2</i>	Ren-Kui <i>et al</i> , [34]; Cobarruvias <i>et al</i> , [40].
	G9055A	<i>ATP6</i>	
	A10397G	<i>ND3</i>	
	G10398A	<i>ND3</i>	
	T16519C	D-loop	
<i>India</i>	G10398A	<i>ND3</i>	Darvishi <i>et al</i> , [41].
<i>Italiana</i>	A153G	D-loop	Parrella <i>et al</i> , [42]; Tommasi <i>et al</i> , [43].
	T195C	D-loop	
	G225A	D-loop	
	T226C	D-loop	
	G3918A	<i>ND1</i>	
	G11719A	<i>ND4</i>	
	G11900A	<i>ND4</i>	
	T12344A	<i>ND5</i>	
	G13708A	<i>ND5</i>	
	G14869A	<i>CYB</i>	
	T16093C	D-loop	
	T16183C	D-loop	
	C16278T	D-loop	
	T16519C	D-loop	
<i>Malaya</i>	G10398A	<i>ND3</i>	Tan <i>et al</i> , [44].
<i>Polaca</i>	A73G	D-loop	Czarnecka <i>et al</i> , [30]; Tommasi <i>et al</i> , [43]
	C150T	D-loop	
	T152C	D-loop	
	T239C	D-loop	
	A263G	D-loop	
	A4727G	<i>ND2</i>	
	G9947A	<i>COIII</i>	
	A10044G	<i>TG</i>	
	A10283G	<i>ND3</i>	
	T11233C	<i>ND4</i>	



Española	C11503T	<i>ND4</i>	Mosquera-Miguel <i>et al</i> , [45]
	T16183C	D-loop	
	T16189C	D-loop	
	C16192T	D-loop	
	T16207C	D-loop	
	C16223T	D-loop	
	T16362C	D-loop	
	T16519C	D-loop	
	G3010A	<i>RNR2</i>	
	T3197C	<i>RNR2</i>	
	A12308G	<i>TL2</i>	
	T16519C	D-loop	

*RNR2*, subunidad de rRNA 16s; *ND1*, subunidad 1 de NADH deshidrogenasa; *ND2*, subunidad 2 de NADH deshidrogenasa; *ND3*, subunidad 3 de NADH deshidrogenasa; *ND4*, subunidad 4 de NADH deshidrogenasa; *ND4L*, NADH deshidrogenasa subunidad 4L; *ND5*, subunidad 2 de NADH deshidrogenasa; *COI*, subunidad 1 de citocromo oxidasa; *COII*, subunidad 2 de citocromo oxidasa; *CYB*, citocromo b; *ATP6*, subunidad 6 de ATP sintasa; *ATP8*, subunidad 8 de ATP sintasa; *TG*, tRNA glicina; *TR*, tRNA arginina; *TH*, tRNA histidina; *TS2*, tRNA serina 2; *TL2*, tRNA leucina.

Se ha explorado el importante papel de los Hg en el desarrollo del CaMa, en población polaca se ha demostrado que los Hg I y H, están asociados al riesgo de desarrollo de CaMa [30]. Se ha reportado una asociación entre Hg y mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2*. Tommasi *et al*, [43] encontraron que los Hg X y H fueron significativamente más frecuentes en sujetos con mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Recientemente se observó que el Hg T1a1, puede modificar el riesgo individual de adquirir la enfermedad en portadores de mutaciones en *BRCA2* [9]. El Hg N, con la variante G10398A, se sabe que es un factor de riesgo para CaMa, particularmente en mujeres de origen afroamericano e indio [46] Bai *et al* [34], demostraron que en población caucásica el Hg K (G10398A y T16189C) aumenta el riesgo de CaMa, mientras que el Hg U confiere protección. Darvishi *et al*, [41] encontraron una asociación entre la distribución del Hg N y la incidencia de CaMa esporádico. Esto fue corroborado a través de un estudio de casos y controles, donde también observaron asociación de la variante A10398C con CaMa esporádico. En la tabla 4 podemos observar los diferentes Hg que se han asociado como factores de riesgo o protección en diferentes poblaciones alrededor del mundo (Tabla 4).

**Tabla 229.** Haplogrupos asociados a CaMa.





<b>Hg</b>	<b>Población</b>	<b>Efecto</b>	<b>Referencias</b>
<i>D5</i>	China	Incrementa el riesgo	Fang <i>et al</i> , [37].
<i>K</i>	Europeo-americana	Incrementa el riesgo en cáncer hereditario	Bai <i>et al</i> , [34]
<i>H</i>	Polaca	Protección	Czarnecka <i>et al</i> , [30].
	Italiana	Incrementa el riesgo	Tommasi <i>et al</i> , [43]
<i>I</i>	Polaca	Incrementa el riesgo	Czarnecka <i>et al</i> , [30].
<i>M</i>	China	Incrementa el riesgo, disminuye la metástasis.	Wang <i>et al</i> , [38].
<i>N</i>	China	Riesgo a metástasis	Fang <i>et al</i> , [37].
<i>U</i>	Europea-americana	Disminuye el riesgo de cáncer hereditario	Bai <i>et al</i> , [34]
<i>X</i>	Italiana	Incrementa el riesgo	Tommasi <i>et al</i> , [43].
<i>T1a1</i>	Multi	Disminuye el riesgo.	Blein <i>et al</i> , [47].

Inicialmente la investigación de la biología del cáncer se centró en las alteraciones genéticas como; mutaciones, deleciones o inserciones: tanto nucleares como mitocondriales, que pudieran explicar las desregulaciones en la expresión genética. Sin embargo, estas alteraciones genéticas, no estaban presentes en todos los pacientes con CaMa. Por ello se inició la investigación de otros mecanismos de regulación como la metilación del DNA, que pudieran afectar la expresión de los genes sin afectar su secuencia, a lo cual se le conoce como epigenética.

### **1.6 Epigenética y cáncer de mama.**

La epigenética, es un campo que ha progresado rápidamente, en biología, en las últimas décadas. Los avances tecnológicos han permitido la caracterización de patrones epigenéticos. La "revolución epigenética", se benefició al identificar familias de proteínas que pertenecen a la maquinaria epigenética. Estas proteínas se agrupan en escritoras de marcas epigenéticas o aquellas que son capaces de eliminar (borrar) las marcas. Las marcas epigenéticas son reversibles y están impulsadas por enzimas que muestran actividades opuestas, como las metiltransferasas del DNA (DNMT) y las desmetilasas (proteínas de translocación,



TET). Las proteínas involucradas en las modificaciones de histonas como la lisina metiltransferasa (HKMT), lisina desmetilasas (HKDM), histona acetiltransferasas (HAT) y la histona desacetilasas (HDAC), entre otras, están implicadas en una variedad de procesos biológicos. Marcas de histonas permisivas, incluidas la acetilación y metilación de lisina (tal como H3K9me1, H3K27me1, H3K36me3, H3K79me3, H3K4me1-3 o H4K20me1) están asociados con la accesibilidad a la cromatina, mientras que la metilación de lisina también es una marca represiva y está involucrada en el silenciamiento transcripcional (por ejemplo, H3K9me3, H3K27me3 o H3K56me3) [48-50].

En el CaMa se ha observado que, una ganancia progresiva en la metilación de promotores de los genes supresores de tumor silencia su expresión y una hipometilación global [49]. La hipermetilación del gen *BRCA1* se ha asociado con tumores de mama negativos para ER y un mal pronóstico asociado a altos niveles de metiltransferasas (DNMT3A, DNMT3B y DNMT1). En estudios preclínicos se ha observado que tanto la mutación genética, como la inactivación epigenética de *BRCA1* por la hipermetilación del promotor, pueden causar una baja regulación de la proteína y la posterior sensibilidad a la inhibición de la *PARP* (poli-ADP-ribosa polimerasa) [48].

La metilación del DNA, hasta hace poco se creía que era un fenómeno que solo ocurría en el DNA nuclear, sin embargo, en recientes estudios se ha observado que este fenómeno también puede ocurrir en el mtDNA. Las implicaciones biológicas que esta metilación del mtDNA pueda tener en el desarrollo del CaMa o alguna otra enfermedad aún se desconocen [51].

### **1.7 Epigenética del mtDNA.**

Las mitocondrias y el mtDNA, juegan un papel importante en la célula, en el mantenimiento y la regulación de la epigenética, al producir s-adenosilmetionina (SAM), que se considera el donante universal de metilo. La metilación del DNA en células eucariotas es una marca epigenética heredable, que comprende la transferencia covalente de un grupo metilo a la posición C-5 del anillo de citosina (5



mC) de DNA por las metiltransferasas de DNA (DNMT1, DNMT3a y DNMT3b) en sitios llamados islas CpG [52-54]

El mtDNA tiene una baja proporción de dinucleótidos CpG (5.25%) [51] en comparación con el DNA nuclear (nDNA; 9.5%) [55]. Se sabe que, en las mitocondrias, no solo las citosinas en las islas CpG pueden metilarse, sino que también cualquiera de los 5182 residuos de citosina del mtDNA, tienen el potencial de ser metilados [56, 57]. Que la DNA metil transferasa DNMT1-isoforma 3 (DNMT1iso3) es la enzima encargada de la metilación del mtDNA [58], que la DNMT3a puede metilar y se localiza en la mitocondria [59]. Yu *et al.* [60] observaron que cuando la DNMT1, DNMT3a o DNMT3b no se expresan en células madre mesenquimatosas del corazón, la metilación del mtDNA disminuye, aunque los mecanismos moleculares específicos aún no se conocen [60].

Se ha observado que la alimentación de cerdos con dietas suplementadas con betaína durante el curso de la gestación, aumenta significativamente la expresión de genes de la OXPHOS codificados en el mtDNA ( $p < 0.05$ ), incluidos *COI*, *COII* y *ND5*, en el músculo de lechones recién nacidos [61] Estos reportes sugieren fuertemente que la metilación del mtDNA, juega un papel como regulador del metabolismo a través de la regulación de la transcripción del DNA, similar a la regulación de la transcripción del DNA nuclear a través de la metilación [62].

La metilación del genoma mitocondrial, ha tenido relevancia en la última década, debido a su asociación con varias enfermedades de importancia clínica [51], se ha observado que los sitios de las citosinas metiladas, varían de acuerdo con la ingesta de proteínas; o por la exposición de contaminantes, en enfermedades como hígado graso alcohólico (NAFLD) o Alzheimer [63-66]. Se ha reportado que, en hiperglicemia, los niveles de metilación del mtDNA aumentan en las células de la retina, lo que ocasiona una regulación negativa en la expresión de los genes mitocondriales, causando ceguera [67]. Este hallazgo sugiere que la epigenética del mtDNA juega un papel importante en la expresión y función mitocondrial, por lo tanto, tienen el potencial de ser utilizados como marcadores epigenéticos de



---

diagnóstico o pronóstico, y posiblemente como nuevos blancos terapéuticos. Los perfiles de metilación específicos, de los datos de mtDNA, que están disponibles en la actualidad son demasiado escasos para asociarse con una enfermedad específica.



## **II Justificación.**

El cáncer de mama es un problema de salud pública a nivel mundial y en México, para 2018 se detectaron 2,088,849 casos nuevos y 626,679 defunciones asociadas a CaMa a nivel mundial, en México para el mismo año se identificaron 27,283 nuevos casos de CaMa, con 6,884 decesos y se estima que la cifra de casos nuevos aumente a 46,315 para el año 2040. Se conoce que variaciones en el DNA nuclear y/o mitocondrial se asocia con la presencia de CaMa, por ejemplo variaciones como T16189C, C16207T, T16519C, T239C y A263G, en la región D-loop del mtDNA en diferentes poblaciones a nivel mundial. Aunado a lo anterior se conoce que la epigenética mitocondrial puede jugar un papel importante con la severidad y evolución de enfermedades como diabetes o Alzheimer, algo que también podría estar ocurriendo en CaMa. Sin embargo, en población mexicana existe poca información sobre las variantes mitocondriales o en la epigenética mitocondrial que pudieran estar causando un efecto en esta población y el desarrollo del CaMa. Por lo que resulta de suma importancia conocer las alteraciones en los haplogrupos y/o metilación del DNA mitocondrial asociadas a dicha enfermedad para contribuir a la generación de conocimiento para el entendimiento de la genética mitocondrial del cáncer de mama, pudiendo impactar con el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico temprano, pronóstico o tratamiento.



---

### **III Hipótesis.**

Si las variaciones en el mtDNA se han asociado como factores de protección o riesgo para el desarrollo del cáncer de mama en diferentes poblaciones y perfiles mitoepigenéticos con la severidad de enfermedades como diabetes y Alzheimer, entonces los cambios que se observen en el mtDNA y el perfil de metilación en población mexicana pueden estar actuando como factores de riesgo o protección a cáncer de mama. Generando este conocimiento se contribuirá a conocer nuevos factores de susceptibilidad relacionada con el desarrollo del cáncer de mama en población mexicana



---

## **IV Objetivos.**

### **4.1 Objetivo general.**

Identificar las variaciones genéticas y cambios en el perfil epigenético del mtDNA asociados a cáncer de mama en la población mexicana.

### **4.2 Objetivos Particulares.**

- i. Identificar los haplogrupos presentes en muestras de pacientes mexicanas diagnosticadas con cáncer de mama.
- ii. Determinar si existe una asociación entre los haplogrupos y/o variaciones del genoma mitocondrial e en mujeres mexicanas con cáncer de mama.
- iii. Identificar el perfil de metilación en la región D-loop del mtDNA de mujeres mexicanas con cáncer de mama.
- iv. Determinar si existe una asociación entre los perfiles de metilación y la presencia de cáncer de mama en mujeres mexicanas.



## V Materiales y métodos.

### 5.1 Material biológico.

Se obtuvieron un total de 282 muestras de pacientes diagnosticadas con CaMa y 176 muestras de sangre periférica de controles, de la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Ginec Obstetricia No 3, Centro Médico Nacional “La Raza”, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), bajo la aprobación del Comité Nacional de Investigación Científica, del IMSS, bajo los números de registro de proyecto: R-2015-785-016 y R-2017-785-071. Toda la información se ha mantenido en estricta confidencialidad, de acuerdo con los reglamentos nacionales e internacionales. Las pruebas se llevaron a cabo, previa firma del consentimiento informado y siguiendo el acuerdo de Helsinki. Todos los participantes fueron debidamente informados y dieron su consentimiento por escrito para cada uno de los procedimientos (Anexo 1).

### 5.2 Extracción y cuantificación de DNA total.

El DNA de las muestras fue extraído mediante el paquete “DNeasy Blood & Tissue Kit” (Qiagen Núm. Cat. 69506, EE. UU.), de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. Las muestras se eluyeron en 50 µl. La concentración del DNA de las muestras se determinó mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Cada muestra se diluyó con la solución de elución EB (Qiagen, EE. UU.), se obtuvo una concentración final de 25 ng/µl de cada una de las muestras, se guardó a 70°C para su almacenamiento y posterior uso.

### 5.3 Amplificación y secuenciación de la región D-loop del mtDNA.

La región D-loop de mtDNA (1.061 pb) se amplificó mediante PCR utilizando primers específicos [68]. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de reacción final de 30 µl, que contenía una unidad de polimerasa de alta fidelidad (Jena Bioscience, Núm Cat. PCR-2014L, Alemania), 0.5 µl del primer L15811 (5'-TCATTGGACAAGTAGCATCC-3'; 20 pmoles/µl), 0.5 µl del primer H775 (5'-AGGCTAAGCGTTTTGAGCTG-3'; 20 pmoles/µl) [68], 0.5 µl de la mezcla dNTP





(Jena Bioscience, Núm. Cat UN-1006, Alemania; mezcla equimolar 10 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), y 40 ng de DNA molde. El programa del termociclador que se usó fue de 3 minutos de activación térmica de la polimerasa de alta fidelidad a 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 40 s, 58°C de alineamiento durante 40 s, 68°C de extensión por 90 s, por último, un ciclo a 68°C por 7 min. Los productos de PCR amplificados, se purificaron usando el kit Sap-Exo (Jena Bioscience, Núm. Cat. PP-218L, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los productos purificados se secuenciaron (*forward* y *reverse*) mediante secuenciación automática en un ABI PRISM 3100 con el Kit de secuenciación de ciclo BigDye Terminator v3.1 (Applied Núm. Cat 4337458 Biosystems, EE. UU.) Utilizando los primers específicos L15811, H11 (5'-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3'; 20 pmoles/ $\mu$ l), L16491 (5'-GAGTGGTTAATAGGGTGATAG-3'; 20 pmoles/ $\mu$ l) y H775 [68], las secuencias obtenidas se usaron para determinar las variantes mitocondriales de cada muestra.

#### **5.4 Determinación de los haplogrupos mtDNA.**

La determinación de los diferentes haplogrupos del mtDNA, se llevó a cabo mediante secuenciación de la región D-loop y la determinación de variantes específicas. Cada una de las secuencias obtenidas, fue comparada con la secuencia de referencia de Cambridge (CRS), las variantes identificadas se clasificaron siguiendo el criterio descrito por Kumar *et al*, [69] y se confirmaron mediante Mitomaster [70], para determinar el Hg y SubHg de cada una de las muestras. Para determinar las variantes específicas en la región codificante para los Hg A, C y D, mediante PCR tiempo real, usando sondas TaqMan específicas para cada uno de los haplogrupos (cada una de las sondas y variantes se describen en la Tabla 5), el equipo StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) y el reactivo qPCR GreenMaster highROX (Jena Bioscience Núm. Cat PCR-368L, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante. En el caso del Hg B se determinó la delección de 9 pb en la región codificante ( $\Delta$ mtDNA8281-8289) con ayuda de los primers L8200 (5'-ATGCTAAGTTAGCTTTACAGTG-3'; 20 pmoles/ $\mu$ l)



H8300 (5'-ACAGTTTCATGCCCATCGTC-3'; 20 pmoles/ $\mu$ l) [68], todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de reacción final de 30  $\mu$ l, que contenía una unidad de polimerasa de alta fidelidad (Jena Bioscience, Núm Cat. PCR-2014L, Alemania), 0.5  $\mu$ l del primer L8200 (20 pmoles/ $\mu$ l), 0.5  $\mu$ l del primer H8300 (20 pmoles/ $\mu$ l), 0.5  $\mu$ l de la mezcla dNTP (Jena Bioscience Núm. Cat UN-1006, Alemania; mezcla equimolar 10 mM de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), y 40 ng de DNA molde, se siguió el protocolo del termociclador: 3 minutos de activación térmica de la enzima a 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 40 s, 56°C de alineamiento por 40 s, 68°C de extensión por 40 s, por último, un ciclo a 68°C, 5 min. Una vez amplificado se analizó mediante una electroforesis en geles de acrilamida al 15% (UltraPure Acrylamide, Invitrogen, Núm. Cat. 15512023, EE. UU), en donde se observó un retiramiento en la separación de banda menor a 100 pb nos indicó que la muestra tiene la delección de 9 pb característica del HgB.

**Tabla 230.** Secuencia de las sondas TacMan usadas para identificar los Hg A, B y D.

<i>Polimorfismo</i>	<i>HG</i>	<i>Secuencia de la sonda 5'-3'</i>	<i>Reportero</i>
A663G	<b>A</b>	TGTTAGTCATGTTA <b>G</b> CTTGTT	VIC
		TGTTAGTCATGTTA <b>T</b> CTTGTT	FAM
A13263G	<b>C</b>	CACTTCAAGTCA <b>A</b> CTAGGAC	VIC
		ACTTCAAGTCA <b>G</b> CTAGGAC	FAM
C5178A	<b>D</b>	TGTTAGTCATGTTA <b>G</b> CTTGTT	VIC
		TGTTAGTCATGTTA <b>T</b> CTTGTT	FAM

### 5.5 Tratamiento con bisulfito y controles negativos de metilación.

La conversión de bisulfito de cada muestra de DNA se realizó usando el kit EZ DNA Methylation Gold (Zymo Research, Núm. Cat. D5005, EE. UU.). Para obtener los controles de DNA sin metilación, se realizó una PCR de la región D-loop con primers específicos [68]. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de reacción final de 30  $\mu$ l compuesto por una unidad de polimerasa de alta fidelidad (Jena Bioscience, Núm Cat. PCR-2014L, Alemania), 0.5  $\mu$ l de primer 15811 (20 pmoles/ $\mu$ l), 0.5  $\mu$ l de primer H775 (20 pmoles/ $\mu$ l), 0.5  $\mu$ l de dNTP mix (Jena



Bioscience, Núm. Cat UN-1006, Alemania; mezcla equimolar de 10 mM dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y 40 ng de DNA molde. El perfil térmico utilizado para la reacción incluyó 3 minutos de activación térmica de la enzima a 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 40 s, temperatura de alineamiento de 58°C por 40 s, extensión a 68°C por 90 s, luego un ciclo a 68°C por 7 min. Los productos de PCR obtenidos se purificaron mediante el kit Sap-Exo (Jena Bioscience, Alemania) según los fabricantes, se determinó la concentración de DNA con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Los productos se almacenaron a -70°C para su uso como controles para la conversión de bisulfito del DNA debido a que el uso de técnicas de amplificación por PCR estándar borra los patrones de metilación.

Para realizar el tratamiento de bisulfito, se agregaron 130 µl del reactivo CT Conversion Reagent, con 450 ng de DNA de las muestras o DNA de templado sin citosinas metiladas (control de conversión) y el agua para alcanzar un volumen final de 150 µl en un tubo de 200 µl. Las mezclas se incubaron en un termociclador, el programa incluyó, 10 min de incubación a 98°C, seguido de incubación a 53°C por 30 min y ocho ciclos de incubación a 53°C por 15 min, seguido otra incubación 37°C por 30 min. Después de la incubación en el termociclador, el DNA tratado se purificó, colocando 600 µl del buffer M-binding en la columna Zymo-Spin IC, enseguida se adicionó la reacción de tratamiento de bisulfito (150 µl) que contenía el DNA tratado, se homogeneizó por inversión y se centrifugó a 14,500 g por 60 s. El sobrenadante se desechó y se agregaron 100 µl del buffer M-wash en la columna, se centrifugó nuevamente a 14.500 g por 60 s. Una vez más se descartó el sobrenadante, ahora se adicionó 200 µl del buffer M-desulphonation en la columna y se incubó a temperatura ambiente por 20 min, para después centrifugar 14,500 g por 60 s. Enseguida se desechó el sobrenadante y se agregaron 200 µl del buffer M-wash a la columna se centrifugó a 14,500 g por 60 s, este paso se repitió en dos ocasiones. Finalmente, el DNA tratado con bisulfito retenido en la columna se eluyó en 13 µl de buffer M-elution, según el protocolo del fabricante (Zymo Research, EE. UU.). Las muestras tratadas se almacenaron a -70°C hasta su uso.



## 5.6 Identificación de los perfiles de metilación en la región D-loop del mtDNA.

Antes de identificar el perfil de metilación de las muestras se determinó el número y la posición de cada citosina en la región D-loop del mtDNA en las muestras con ayuda del software Bioedit (Ibis Therapeutics, versión 7.0.5.3, EE. UU.) y las secuencias obtenidas previamente como se describe en las secciones 5.3 y 5.4.

Para identificar el perfil de metilación en la región D-loop del mtDNA, se desarrolló una metodología basada en RT-PCR bisulfite sequencing. El método de RT-PCR consistió en la amplificación de la región D-loop dividida en tres subregiones (T1, T2 y T3), con primers específicos (Tabla 6) y la purificación de cada amplicón después del tratamiento con bisulfito. El procedimiento fue el siguiente: después del tratamiento con bisulfito de cada muestra se tomaron 6,5  $\mu$ l de DNA tratado en tres tubos de 200  $\mu$ l, a cada tubo se agregó 0,5  $\mu$ l de cada primer forward específico (20 pmoles/ $\mu$ l) y el agua necesaria para alcanzar un volumen final de 15  $\mu$ l. Después, cada tubo se incubó durante 5 minutos a 95°C. Terminando la incubación los tubos se colocaron a 0°C por dos minutos. En seguida se adicionaron 4  $\mu$ l de buffer 5x “first-strand” y 1  $\mu$ l de (200 unidades/ $\mu$ l) de enzima SuperScript III (Invitrogen, EE. UU.). Los tubos con las mezclas se incubaron a 50°C por 50 min, con un ciclo final de 5 min a 70°C. Posteriormente se tomaron 6  $\mu$ l de la mezcla de RT y se colocaron en un tubo de 200  $\mu$ l, al cual se le agregaron 3  $\mu$ l de buffer 10X, 0.5  $\mu$ l de cada uno de los primers (20 pmoles/ $\mu$ l) T1F1-R2, T2F3-R4 y T3F5-R6 (Tabla 6), 0.5  $\mu$ l de mezcla de dNTP (Jena Bioscience, Alemania; mezcla equimolar de dATP 10 mM, dCTP, dGTP y dTTP), 0.5 unidades de DNA polimerasa HiFi (Jena Bioscience, Alemania) y suficiente agua para tener un volumen final de 30  $\mu$ l.

El termociclador se programó con 3 minutos de activación de la polimerasa de alta fidelidad a 95°C, seguido de 10 ciclos de desnaturalización a 95°C por 40 s, una temperatura de alineamiento a 44°C por 40 s y extensión a 68°C por 60 s; seguido de 35 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 95°C por 20 s, una temperatura de alineamiento específica para cada par de primers por 20 s



(Tabla 6) y extensión a 68°C por 60 s, con un ciclo final elongación a 68°C por 7 min. Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa (Ultrapure, Invitrogen, Núm. Cat.16500500, EE. UU.) al 1,5% y purificados mediante el kit de extracción de gel Qiaquick (Qiagen, Núm. Cat. 28106, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para obtener la secuencia de cada amplicón se usó el Kit de secuenciación de ciclo BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Núm. Cat. 4337458, EE. UU.) y los primers específicos de cada fragmento con ayuda del secuenciador ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, EE. UU.).

**Tabla 231.** Secuencia, localización y temperatura de alineamiento de los primers usados en la RT-PCR para cada fragmento en la región D-loop de mtDNA.

Región	Primer	Secuencia del primer (5'-3')*	Posición (nt)	Temperatura de alineamiento °C	Tamaño del amplicón (pb)
T1	F1	<b>AGGAAGAGAG</b> GATTTTAATTTAAATTATT	16000-16019	46.5	432
	R2	<b>AGGAAGAGAG</b> ATTTTCACAAAAATAATA	16417-16435		
T2	F3	<b>AGGAAGAGAG</b> TATTATTTTTGTGAAATTAA	16401-16422	47	363
	R4	<b>AGGAAGAGAG</b> AACATAAATACAATAAATAA	173-193		
T3	F5	<b>AGGAAGAGAG</b> TTATTTATTGTATTTATGTT	154-174	46.5	442
	R6	<b>AGGAAGAGAG</b> ACCCATCTAAACATTTTCAA	628-648		

Los *primers* fueron diseñados previamente por Bellizzi *et al.*[57]; F, Forward; R, Reverso; nt = nucleótido; pb = pares de bases.

El tratamiento con bisulfito modifica el DNA, convierte los residuos de citosina no metilados a uracilo. Lo que provocó que las citosinas no metiladas (C) se convierten en timina (T) una vez que se secuencio después del tratamiento con bisulfito. Como resultado, las citosinas que no se transforman a uracilo por el tratamiento con bisulfito se identifican como metiladas [56, 57, 71]. En consecuencia, el estado de metilación del mtDNA se interpretó comparando las secuencias con y sin tratamiento con bisulfito. Las secuencias obtenidas de cada muestra fueron ensambladas por el software Bioedit (Ibis Therapeutics versión 7.0.5.3, EE. UU.) y comparadas con la secuencia de misma muestra obtenida previamente sin tratamiento con bisulfito y a si determinar los sitios y el perfil de metilación de cada muestra.



---

### **5.7 Análisis estadísticos.**

La correlación entre cada alteración del mtDNA en muestras tumorales y su tejido normal adyacente y las muestras control se analizó mediante la prueba exacta de Fisher utilizando el paquete estadístico Epidata (Ibis Therapeutics versión 7.0.5.3, EE. UU.). La correlación entre los grupos se consideró estadísticamente significativa si el valor p fue inferior a 0,05. Además, para cada variante, se calcularon el odds ratio (OR) y el intervalo de confianza del 95% (IC del 95%) para determinar su asociación con el mayor riesgo en pacientes con cáncer de mama. La asociación entre la alteración del mtDNA y las características clínico-patológicas de pacientes con cáncer de mama con más de una mutación sin sentido se evaluó mediante el análisis ANOVA unidireccional.



## VI Resultados.

### 6.1 Características de las muestras recolectadas.

En el transcurso de cuatro años (2014-2018) se recolectaron un total de 458 muestras. De las cuales, 176 de ellas fueron recolectadas como muestras control, de mujeres sin diagnóstico de CaMa; de estas, 117 fueron de tejido mamario y 59 de sangre periférica. Las 282 muestras restantes, fueron colectadas de pacientes con diagnóstico de CaMa, de las cuales se obtuvieron tres tipos de muestras: tejido tumoral, tejido adyacente y sangre periférica; dando un total de 282 muestras de tejidos tumorales, 263 de tejidos adyacentes y 108 de sangre periférica. La tabla 7 muestra todos estos datos con mayor detalle.

**Tabla 232.** Muestras recolectadas para este estudio en el CMN “La Raza”.

<i>Muestras</i>	<i>Origen</i>	<i>N</i>	<i>Tejido</i>	<i>N por Tejido</i>	<i>DNA</i>
<i>Pacientes</i>	CMN La Raza	282	Tumoral	282	282
			Adyacente	263	263
			Sangre	108	108
<i>Controles</i>	CMN La Raza	176	Mama	117	117
			Sangre	59	59

**CMN** = Centro Médico Nacional; **N** = número de muestras.

La edad promedio en la que se detectó el CaMa en las pacientes fue de 57.3 años, a once de las pacientes les fue diagnosticado el CaMa antes de los 35 años (3.9%), a 36 de las pacientes entre los 35-45 años (12.77%), a 73 de las pacientes entre los 45-55 años (25.45%) y 162 de las pacientes de 55 años o más (57.45%; Tabla 8).

El índice de masa corporal (IMC) que presentaron las pacientes fue: normal en 43 pacientes (15.24%), sobrepeso en 133 pacientes (47.16%), obesidad leve en 86 pacientes (30.49%), obesidad media con 11 pacientes (3.9%) y obesidad mórbida en 9 pacientes (3.19%).



La edad promedio de la menarca de las pacientes fue de 12.43 años, 71 pacientes la presentaron antes de los 12 años (25.17%) y 211 pacientes (74.82) a los 12 años o más. Veintidós de las pacientes (7.8%) no habían presentado su menopausia al momento de ser diagnosticadas con CaMa, 217 pacientes (76.95%) la tuvieron antes de los 55 años y 43 pacientes (15.24%) a los 55 años o más. La Tabla 8 presenta todos los datos de las muestras de manera detallada. A lo que se refiere a estilo de vida 51 (18.08%) de los pacientes afirmaron ser fumadores cotidianos, sociales o alguna vez haber fumado, mientras 231 de los paciente (81.81%) aceptaron jamás haber fumado. 245 de los pacientes (86.87%) reportaron ser bebedores sociales y 37 pacientes (13.12) reportaron no beber alcohol (Tabla 8).

En el momento de la extracción del tumor mediante la cirugía se determinó la etapa que presentaba cada una de la muestra, 19 (6.74%) de ellas correspondieron a la etapa IA (7.8%), 0.22 correspondieron a la etapa 6 etapa IB (2.13%), 56 a la etapa IIA (19.86%), 48 a la etapa IIB (17.02%), 74 a la etapa IIIA (26.24%), 28 a la etapa IIIB (9.93%), 20 etapa IIIC (7.09%) y nueve de la etapa IV (3.19%). Así mismo se determinó la ausencia o presencia de los receptores de estrógeno (RE), progesterona (PR) y factor de crecimiento epidérmico humano dos (Her2). Asimismo, se determinó que siete de las (2.48%) muestras presentaron RE positivo (RE+) PR positivo (PR+) y Her2 positivo (Her2+); 210 (74.47%) RE+, PR+ y Her2 negativo (Her2-); siete (2.48%) RE+, PR negativo (PR-) y Her2+; nueve (3.19%) RE+ PR- y Her2-; 18 (6.38%) RE-, PR- y Her2+; y 31 (10.99%) muestras fueron triples negativas lo que quiere decir la ausencia de los 3 receptores (RE-, PR- y Her2-). En la tabla 8 se pueden observar toda las característica de los pacientes que donaron las muestras, las cual es de suma para su estudio. .





**Tabla 233.** Características clínicas y epidemiológicas de las muestras diagnosticadas con CaMa.

	<i>Parámetro</i>	<i>N</i>	<i>F (%)</i>
<i>Edad</i>	<35	11	3.90
	> 35 ≤ 45	36	12.77
	> 45 ≤ 55	73	25.89
	> 55	162	57.45
<i>IMC</i>	Normal	43	15.24
	Sobrepeso	133	47.16
	Obesidad leve	86	30.49
	Obesidad media	11	3.9
<i>Fumador</i>	Obesidad mórbida	9	3.19
	Si	51	18.08
<i>Bebedor</i>	No	231	81.91
	Si	245	86.87
<i>Menarca (años)</i>	No	37	13.12
	>12	71	25.17
<i>Menopausia</i>	≤12	211	74.82
	Sin	22	7.8
	>55	217	76.95
<i>Etapa</i>	≤55	43	15.24
	0	19	6.74
	IA	22	7.80
	IB	6	2.13
	IIA	56	19.86
	IIB	48	17.02
	IIIA	74	26.24
	IIIB	28	9.93
	IIIC	20	7.09
	IV	9	3.19
<i>Receptores</i>	RE+, PR+ Her2+	7	2.48
	RE+, PR+, Her2-	210	74.47
	RE+, PR-Her2+	7	2.48
	RE+ PR-, Her2-	9	3.19
	RE-, PR-, Her2+	18	6.38
	RE- PR-, Her2-	31	10.99

*IMC*= Índice de masa corporal; *RE*= Receptor de estrógenos; *RP*= Receptor de progesterona;  
*Her2*= receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

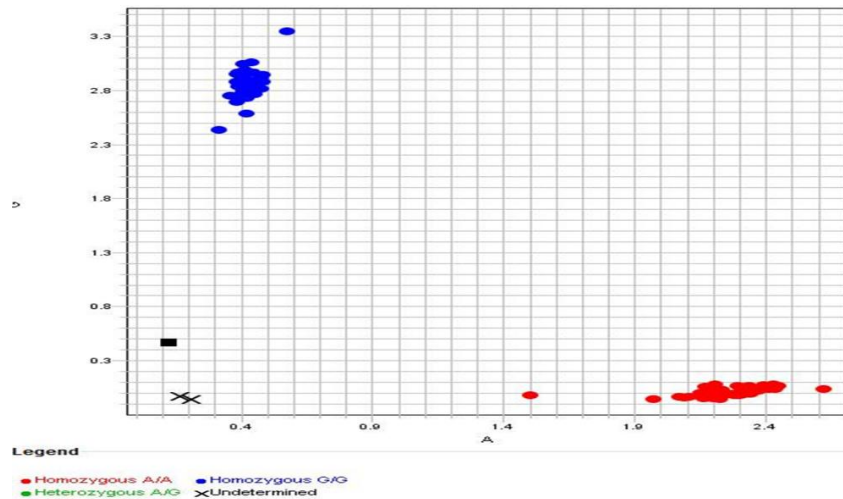
## 6.2 Determinación de los haplogrupos y subhaplogrupos del mtDNA.

La determinación de los Hg se realizó a través de diferentes acercamientos; el primero fue mediante PCR en tiempo real, mediante sondas específicas para los Hg A, C y D. Mediante esta técnica y la sonda específica para HgA se identificó el

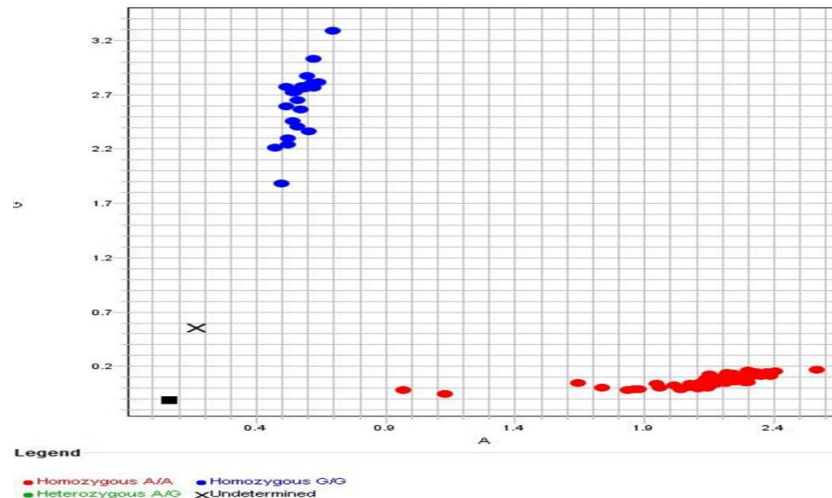


polimorfismo A663G, se identificaron 77 (44.51%) muestras en el grupo de controles y 126 (61.76%) en el grupo de pacientes con este polimorfismo (Figura 7).

Para HgC, se usó la sonda que identifica el cambio A13263, mediante esta aproximación se identificaron 35 (20.23%) de las muestras en el grupo de controles tuvieron esta variante, y 42 (20.59%) pacientes presentaron este polimorfismo (Figura 8).



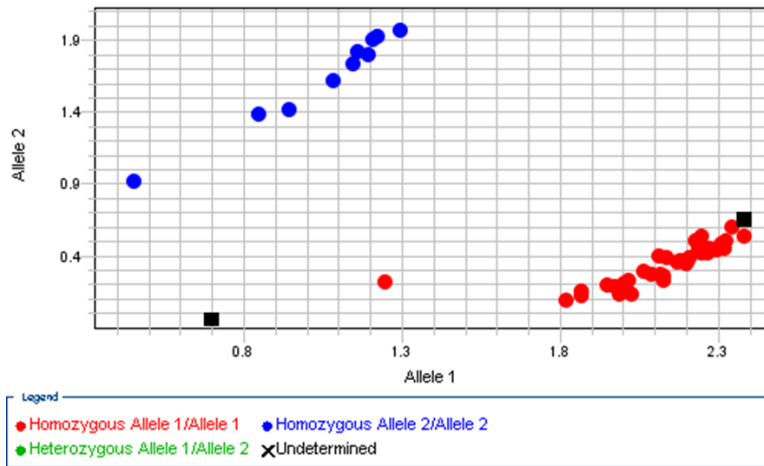
**Figura 7.** Gráfica de discriminación alélica para el HgA. El grupo de puntos de color rojo indican las muestras que presentaron el alelo A; los puntos de color azul corresponden al alelo G.



**Figura 8.** Gráfica de discriminación alélica para el HgC. El color rojo indica las muestras que presentaron el alelo A; los puntos de color azul corresponden al alelo G.



En el Hg D se determinó el cambio T5178G, en el grupo control se identificó que cuatro (2.31%) muestras presentaban este polimorfismo, en el grupo de pacientes también se identificó la presencia de esta variante en cuatro (1.96%) muestras (Figura 9).



**Figura 9.** Gráfica de discriminación alélica del HgD. Los puntos de color rojo indican las muestras que presentan el alelo T; los puntos de color azul corresponden al alelo G, muestras que presenta.

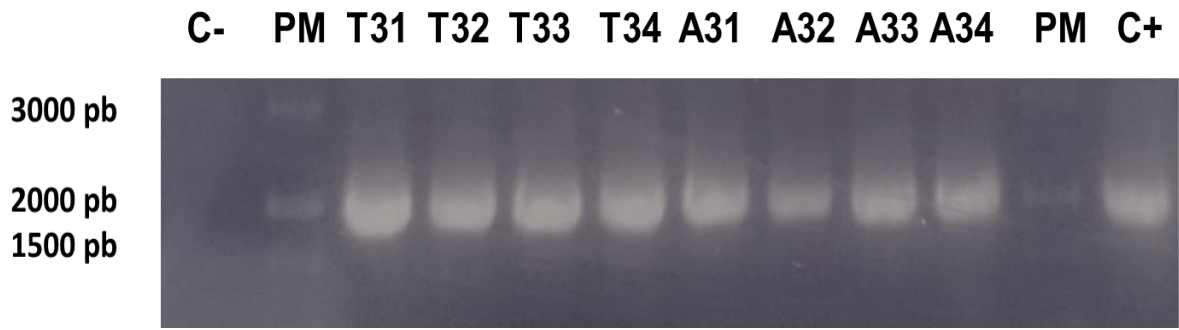
Para identificar el HgB en la región codificante se usó PCR punto final con primers específicos L8200-H8300, que flanquearon la delección de nueve pares de bases característica de este haplogrupo, esta delección se identificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%. Siguiendo esta estrategia se identificaron 49 (28.32%) muestras en el grupo de controles y 23 en el grupo de pacientes (11.27%; Figura 10).



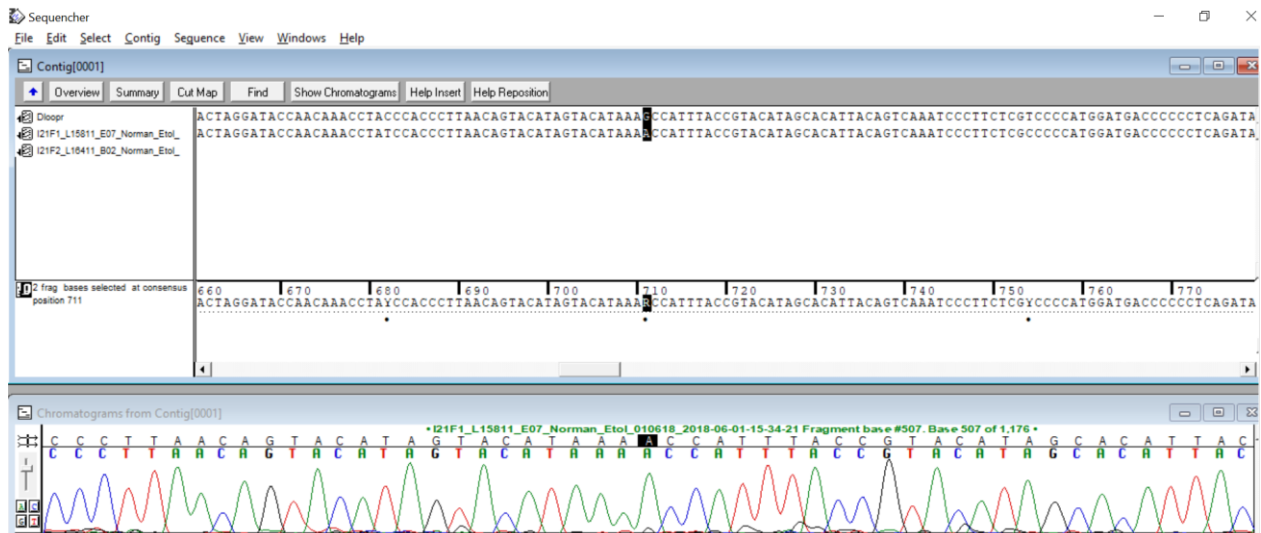
**Figura 10.** Electroforesis del producto de PCR para identificar la delección 8281-8289 característica del HgB. **PM**= Marcador de Peso Molecular, **C-**= Agua libre de nucleasas, **C-**= Muestra diferente de HgB, **C+**= Muestra HgB.



Para identificar el resto de los Hg, así como los subhaplogrupo de las muestras, se realizó la amplificación de la región D-loop con los primers específicos L15811-H775 (Figura 11), seguida de la secuenciación Sanger del amplificado. Las secuencias ensambladas se compararon con la CRS, en la figura 12 se observa el alineamiento de la secuencia obtenida de la muestra WT35 con CRS. para obtener las variaciones en la secuencia de cada una de las muestras. De igual manera se realizó el alineamiento en la base de datos Mitomap para comparar con el resultado obtenido del programa Sequencher (Figura 13).



**Figura 11.** Electroforesis del amplifcon de la región D-loop del mtDNA. Producto de 1463 pb de las muestras 31-34 **PM**= Marcador de peso molecular; **C-**Control negativo; **C+**= Control positivo; **A**= Tejido adyacente; **T**= Tejido tumoral.



**Figura 12.** Alineamiento y comparación de la secuencia problema con CRS.



Se identificaron en el grupo de pacientes cinco muestras HgL (2.45%), una muestra HgJ (0.49%), una muestra HgK (0.49%), una muestra HgU (0.49%) y una muestra HgM (0.49%) en el grupo de controles cinco muestras del HgA con cinco muestras (2.89%), una muestra de HgU (0.58%), una muestra HgJ (0.58%) y una muestra HgG (0.58%; Figura 14).

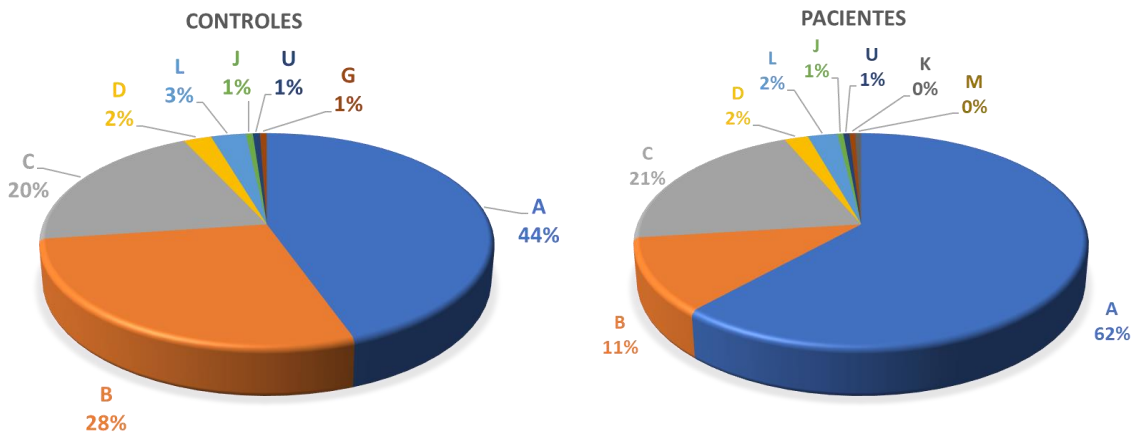
### Sequence alignment

Click the **Variant Details** button below to show variant details.

Show  entries Search:

Sequence ▲	Predicted Haplogroup ▼	Total Variants ▼	Variants ▼	
User	A2 (A2+ (64)+@16111)	17	C64T, A73G, T146C, A153G, A235G, A263G, C315CC, AC523d, A600d, A663G, A750G, A761G, A15879G, C16223T, C16290T, G16319A, T16362C	<a href="#">Variant Details</a>

**Figura 13.** Ejemplo de secuencia de HgA obtenido de la base de datos Mitomap. Se observa las Hg y las variantes mitocondriales identificadas en la secuencia de la muestra WT35 mediante el uso de Mitomap



**Figura 14.** Haplogrupos identificados. Controles (N=176). Pacientes (N=210).

Se identificaron un total de 33 sub-haplogrupos (subHg) en el grupo control, de los cuales 13 pertenecen al HgA clasificados de acuerdo a sus variantes en haplogrupos A, A2, A12, A19, A2a, A2b, A2e, A2g, A2m, A2q, A2u, A2v y A2w; siete



se clasificaron como HgB, los cuales correspondieron a B2, B2c, B2i, B2o, B2u, B2x y B4; cinco correspondieron al HgC separados por sus variantes en los haplogrupos C1, C1b, C1c, C1d y C4a; y los que correspondieron al HgD fueron se identificó D1m; cuatro para HgL los cuales fueron L2, L2b, L3b y L3h; para HgU se identificó el U2e; para HgJ el J1 y para HgG fue G1a (Tabla 9).

En el grupo de pacientes se identificaron 26 sub-Hg, de los cuales nueve fueron de HgA con A, A2, A2a, A2d, A2e, A2g, A2q, A2u y A2x; para HgB se identificaron cinco B2, B2g, B2u, B2x y B4; en HgC se detectaron cuatro que fueron C1, C1b, C1c y C4a; dos para HgD los cuales fueron únicamente cuatro clasificados en D1m y D4. También se identificaron haplogrupo europeos, que clasificamos como haplogrupo L que correspondieron a L2b y L3h; uno europeo HgU, que corresponden a U2e y HgJ el cual fue J1; para HgK que se identificó como K1, y HgM clasificado como M7c (Tabla 9). Estos resultados se presentan con detalle en la Tabla 9.

**Tabla 234.** Haplogrupos y subhaplogrupos de muestras problemas y controles, así como su frecuencia.

Hg	Controles					Pacientes				
	N	F	subHg	N	F	N	F	subHg	N	F
A	77	0.4451	A	7	0.04	126	0.6176	A	12	0.0588
			A2	28	0.16			A2	58	0.2843
			A12	3	0.02			A2a	15	0.0735
			A19	1	0.01			A2d	4	0.0196
			A2a	9	0.05			A2e	6	0.0294
			A2b	2	0.01			A2g	9	0.0441
			A2e	4	0.02			A2q	6	0.0294
			A2g	4	0.02			A2u	11	0.0539
			A2m	1	0.01			A2x	5	0.0245
			A2q	2	0.01					
			A2u	11	0.06					
			A2v	4	0.02					
			A2w	1	0.01					
			B	49	0.2832			B4	35	0.20
B2	2	0.01				B2	2	0.0098		
B2c	3	0.02				B2g	3	0.0147		
B2i	2	0.01				B2u	2	0.0098		
B2o	2	0.01				B2x	3	0.0147		
B2u	2	0.01								
B2x	3	0.02								

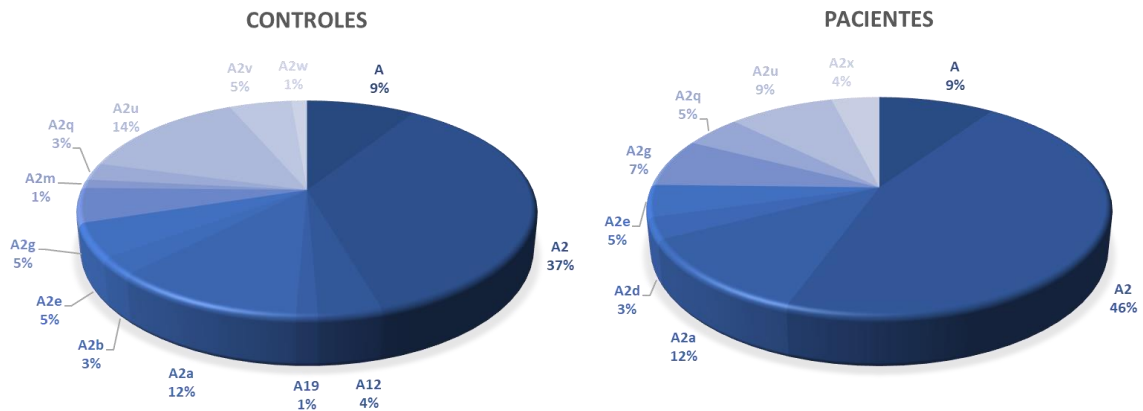


<b>C</b>	35	0.2023	C1	11	0.06	42	0.2059	C1	14	0.0686
			C1b	10	0.06			C1b	12	0.0588
			C1c	7	0.04			C1c	12	0.0588
			C1d	4	0.02			C4a	4	0.0196
			C4a	3	0.02					
<b>D</b>	4	0.0231	D1m	4	0.02	4	0.0196	D1m	2	0.0098
								D4b	2	0.0098
<b>L</b>	5	0.0289	L2	1	0.01	5	0.0245	L2b	3	0.0147
			L2b	2	0.01			L3h	2	0.0098
			L3d	1	0.01					
			L3h	1	0.01					
<b>U</b>	1	0.0058	U2e	1	0.01	1	0.0049	U2e	1	0.0049
<b>J</b>	1	0.0058	J1	1	0.01	1	0.0049	J1	1	0.0049
<b>G</b>	1	0.0058	G1a	1	0.01					
<b>K</b>						1	0.0049	K1	1	0.0049
<b>M</b>						1	0.0049	M7c	1	0.0049
	176	1.0000		173	1.00	210	1.0000		204	1.0000

### 6.3 Variantes mitocondriales en las muestras de pacientes.

Para identificar las variantes en el mtDNA, las secuencias obtenidas de cada una de las muestras se compararon con la CRS, con las variantes identificadas de determino el subHg de cada muestra. Para facilitar el análisis las muestras se dividieron en cinco grupos, los cuales fueron: HgA, HgB, HgC, HgD y Hg no amerindios.

De todos los haplogrupos el más frecuente fue el haplogrupo A con un total de 126 muestras. A su vez el HgA se clasifico en 9 sub-haplogrupos de acuerdo a sus variantes como sigue: A (9%), A2 (46%), A2a (12%), A2d (3%), A2e (5%), A2g (7%), A2q (5%), A2u (9%) y A2x (4%). Los resultados se muestran de manera gráfica en la Figura 15. En total se identificaron 86 variantes dentro de este haplogrupo.

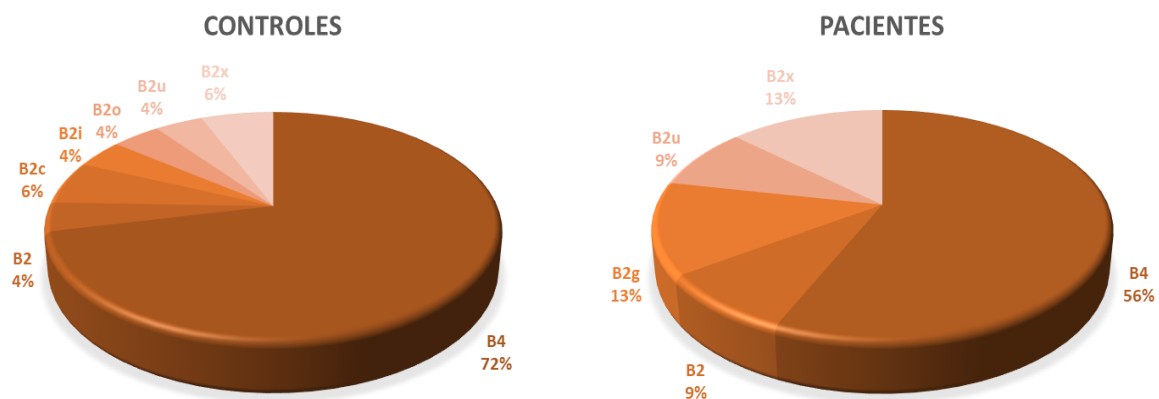


**Figura 15.** Subhaplogrupos del HgA identificados en el estudio. Controles (N=77); Pacientes (N= 126).

El segundo haplogrupo observado en frecuencia fue el B con un total de 49 muestras y dentro de este se se identificaron los siguiente cinco diferentes subhaplogrupos: B2 (9%), B2g (13%), B2u (9%), B2x (13%) y B4 (56%) (Figura 16). En total se identificaron 33 variantes en el HgB.

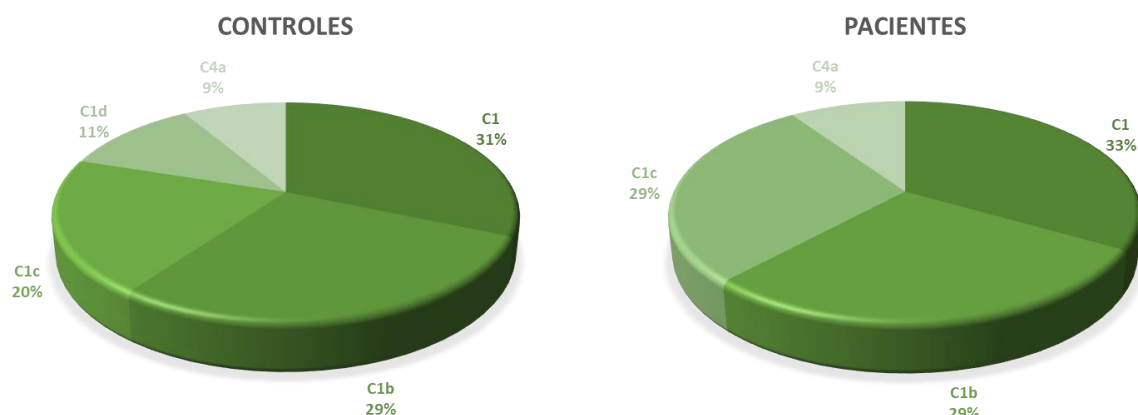
El tercer haplogrupo observado en cuanto a frecuencia fue el HgC y dentro de este se identificaron los sub-haplogrupos C1 (35%), C1b (29 %); C1c (29%) y C4a (9%) mostrados en la Figura 17. En el HgC se identificaron 30 diferentes variantes

En el HgD se identificaron dos subhaplogrupos D1m (50%) y D4b (50%), que podemos observar en la Figura 18 y un total de diecinueve variantes.

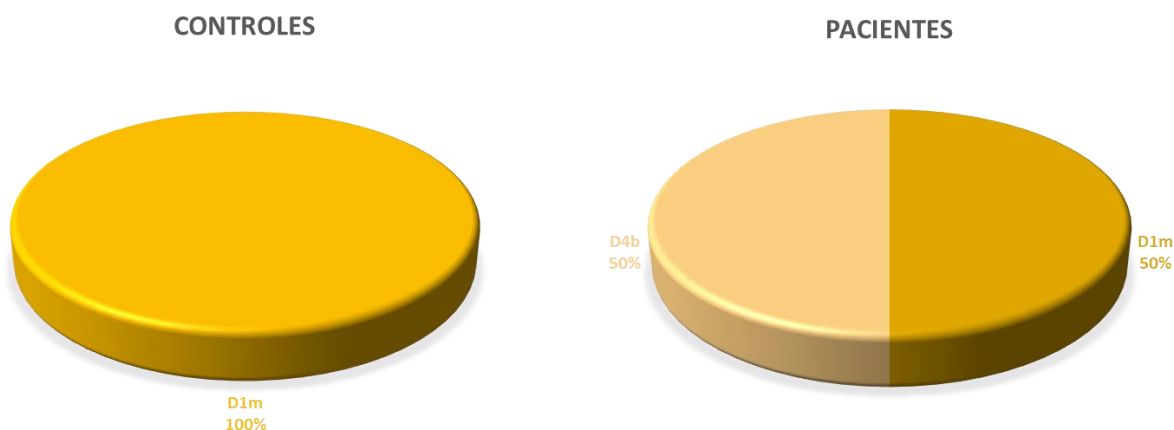


**Figura 16.** Subhaplorupos del HgB identificados en el proyecto. Controles (N= 49), Pacientes (N=23).





**Figura 17.** Subhaplogrupos del HgC. Controles (N=35) Pacientes (N= 42).



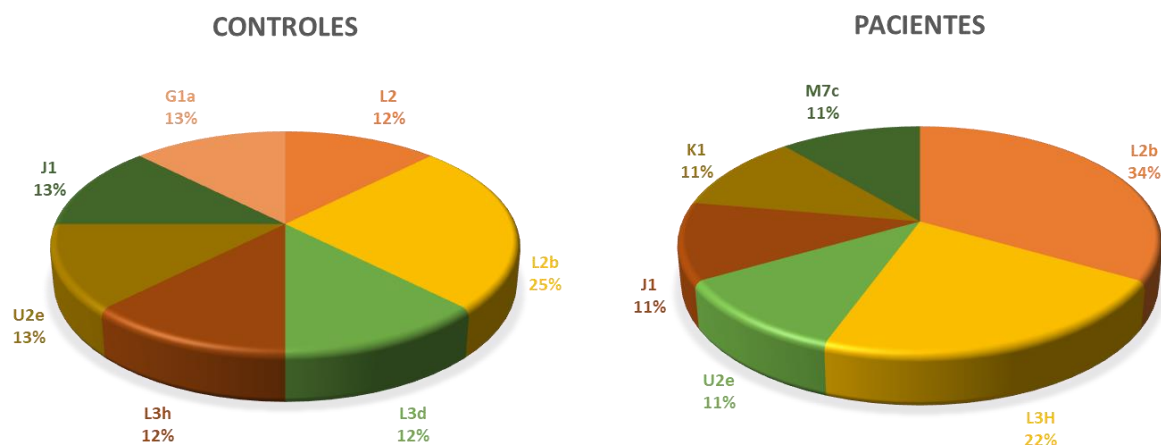
**Figura 18.** Subhaplogrupos del HgD presentes en las muestras. Controles (N=4), Pacientes (N=4)

Dentro del Hg no amerindio se observaron seis sub-haplogrupos, que fueron L2b (34%), L3h (22%), U2e (11%), K1 (11%), M7c (11%), y 31 variantes que se pueden observar en la Tabla 10.

**Tabla 235.** Variantes de los haplogrupos no amerindios

CRS	SubHg	A	G	T	T	G	A	T	C	G	A	C	-	-	T	T	C	A	A	A	C	T	C	G	C	C	A	T	T	G	G	T		
WT37	J1	G	•	•	•	A	G	•	•	A	G	T	ins. C	ins. C	C	•	•	•	•	•	T	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	
WT35	K1	G	•	C	C	•	•	•	•	•	G	•	•	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
WT48	L2B	G	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	ins. C	ins. C	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	
WT55	L2B	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	•	ins. C	ins. C	•	C	•	•	G	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	A	C
WT70	L2B	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	G	•	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C
WT42	L3H	G	A	C	C	•	•	C	T	•	G	•	•	ins. C	•	C	•	C	•	T	•	•	A	T	T	G	•	•	A	•	•	•	C	
WT65	L3H	G	•	C	C	•	•	C	•	•	G	•	ins. C	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	T	G	•	A	•	C	
WT39	M7C	G	•	C	C	•	•	•	•	•	G	•	•	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C
WT12	U2E	G	•	•	•	•	•	C	T	•	G	•	ins. C	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C

**CRS:** Secuencia de Referencia de Cambridge. **WT:** Cáncer de mama (número de paciente), **A:** Adenina, **C:** Citosina, **G:** Guanina, **T:** Timina, **d.:** Delección, **ins.:** Inserción.



**Figura 19.** Sub-haplogrupos no amerindios en los grupos. Controles (N=8), Pacientes (N=9).

#### 6.4 Asociación de los haplogrupos o variantes con cáncer de mama.

Se analizó la asociación de los cuatro haplogrupos amerindios A, B, C, y D, así como cada uno de sus sub-haplogrupos, con la presencia de CaMa en pacientes mexicanos, mediante un análisis de *Odds Ratio* (OR) con un nivel de confianza del 95% y una significancia de  $p=0.05$ . Siguiendo esta metodología se observó que el HgA presentó un OR de 2.09, con un índice de confianza (IC) de 1.37-3.19 con un valor de  $P$  igual a 0.0008; para el HgB se observó un OR de 0.32, un IC de 0.18-0.55 y un valor de  $P$  de 0.0001; HgC presentó un OR de 1.02, IC de 0.61-1.68 y un valor de  $P$  de 0.95; mientras que para HgD se observó un OR 0.849, un IC de 0.226-3.189 y un valor de  $P$  0.923.

**Tabla 236.** Análisis de asociación de haplogrupos y subhaplogrupos mitocondriales con la presencia CaMa.

Hg	subHg	Controles		Pacientes		OR	IC 95%		P
		N	F	N	F				
A		77	0.4451	126	0.62	2.09	1.37	3.19	0.0008
	A12	3	0.02	-	-				
	A19	1	0.01	-	-				
	A2	28	0.16	58	0.2843	2.12	1.28	3.53	0.003
	A2a	9	0.05	15	0.0735	1.42	0.61	3.28	0.25
	A2b	2	0.01	-	-				
	A2d	-	-	4	0.0196	7.83	0.41	146.52	0.08
	A2e	4	0.02	6	0.0294	1.23	0.36	4.19	0.75



	A2g	4	0.02	9	0.0441	1.84	0.58	5.76	0.39
	A2m	1	0.01	-	-				
	A2q	2	0.01	6	0.0294	2.25	0.51	9.85	0.29
	A2u	11	0.06	11	0.0539	0.84	0.36	1.96	0.82
	A2v	4	0.02	5	0.0245	1.04	0.29	3.69	1
	A2w	1	0.01	-	-				
<b>B</b>		49	0.28	23	0.11	0.32	0.18	0.55	0.0001
	B4	35	0.2	13	0.0637	0.27	0.14	0.53	0.0001
	B2	2	0.01	2	0.0098	0.85	0.14	4.97	0.78
	B2c	3	0.02						
	B2g			3	0.0147	6.05	0.31	118.15	0.71
	B2i	2	0.01						
	B2o	2	0.01						
	B2u	2	0.01	2	0.0098	0.84	0.14	4.94	0.78
	B2x	3	0.02	3	0.0147	0.85	0.19	3.75	0.86
<b>C</b>		35	0.2	42	0.2	1.02	0.61	1.68	0.95
	C1	11	0.06	14	0.0686	1.08	0.48	2.41	0.84
	C1b	10	0.06	12	0.0588	1.01	0.43	2.37	0.85
	C1c	7	0.04	12	0.0588	1.44	0.57	3.67	0.57
	C1d	4	0.02						
	C4a	3	0.02	4	0.0196	1.09	0.26	4.51	0.81
<b>D</b>		4	0.023	4	0.0196	0.849	0.226	3.189	0.923
	D1m	4	0.023	2	0.0098	0.467	0.98	2.222	0.551
	D4b			2	0.0098	4.305	0.205	90.321	0.6578

**Hg**= Haplogrupo; **SubHg**= Subhaplogrupo; **N**= número de muestras; **F**= Frecuencia; **OR**= Odds ratio; **IC**= Índice de confianza; **P**= Valor de *P*.

En total se analizaron 19 sub-haplogrupos, de los cuales nueve fueron de HgA, cinco de HgB, cuatro de HgC y dos de HgD. Los OR's, IC's y valores de *P* de cada uno de los subhaplogrupos se pueden observar en la Tabla 11.

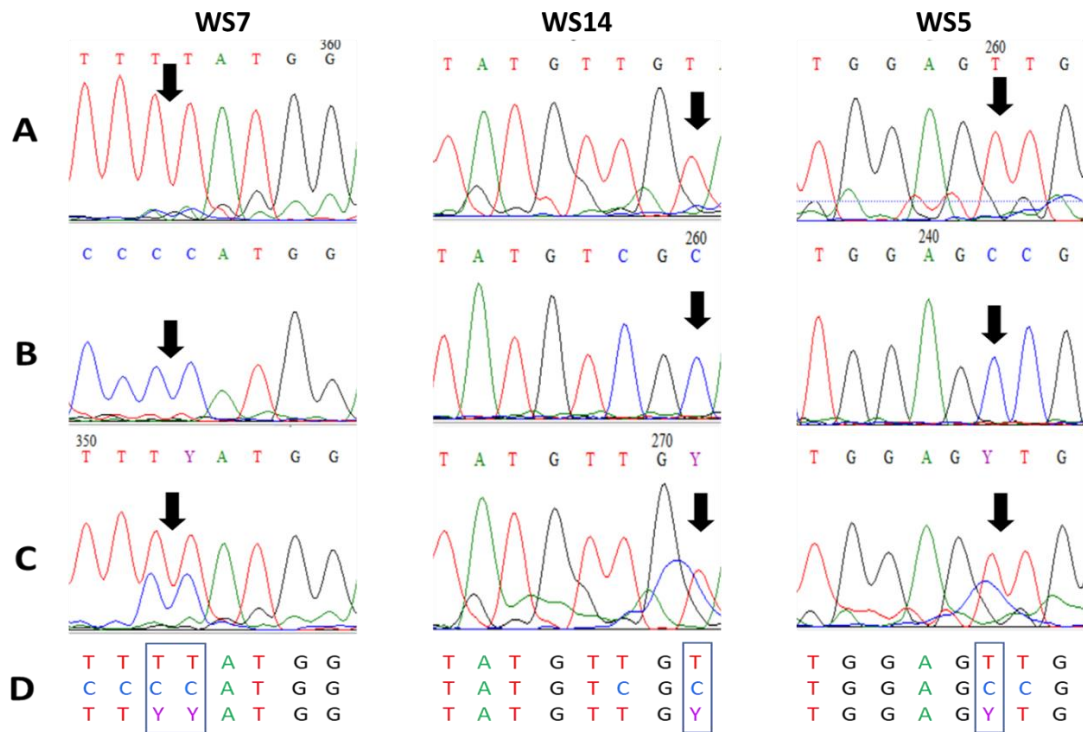
Un total de 133 variantes de la región D-loop de mtDNA se identificaron en las muestras de pacientes. Para todas las variantes identificadas, se analizó la asociación con la presencia de CaMa en pacientes mexicanas, mediante *Odds ratio* con un intervalo de confianza del 95% y una significancia de  $p=0.05$ . Los resultados obtenidos de este análisis nos muestran que la variante T16189C actúa como un factor de protección con un valor de OR de 0.3802, un IC 95% (0.22-0.64) y un valor *p* de 0.0004; la variante T16362C tuvo un valor OR de 2.45, un IC 95% (1.34-3.09),



con un valor  $p$  de 0.0008, lo que nos indica que esta variante podría actuar como un factor de riesgo para el desarrollo de CaMa.

### **6.5 Identificación del perfil de metilación en la región D-loop del mtDNA.**

Usando el método basado en la RT-PCR, “bisulfite sequencing” que se desarrolló en el laboratorio para la identificación de citocinas metiladas, se obtuvieron 42 secuencias que tuvieron las subregiones T1, T2 y T3; 79 con las subregiones T1 y T2; 21 de la región T1; 39 de T2 y 8 de T3 respectivamente. Al tratar el mtDNA de las muestras con bisulfito, las citocinas no metiladas fueron convertidas a uracilos por el proceso de desaminación, al momento de realizar la RT-PCR sequencing el uracilo se identifica como la base análoga timina, por otro lado en las citocinas que presentaron un grupo metilo en la posición 5, no se ven afectadas al llevar a cabo el proceso de desaminación, citocinas no metiladas se observaron como timinas, mientras que las citocinas metiladas no cambiaron en las secuencias obtenidas. Al comparar los electroferogramas obtenidos mediante la RT-PCR bisulfite sequencing con la secuencia de la misma muestra sin tratamiento con bisulfito, se obtuvo el sitio y el número de citocinas metiladas en cada muestra. En la figura 20 se puede observar la secuencia de los controles de metilación en la sección A, en la sección B se observa la secuencia sin tratamiento con bisulfito y en la sección c se puede observar la secuencia con tratamiento de bisulfito de las muestras WS5, WS7 y WS14.



**Figura 20.** Electroferogramas de las muestras WS5, WS7 y WS14, con y sin tratamiento con bisulfito, así como sus controles negativos. Control de la conversión de bisulfito de DNA (A); secuencia del DNA sin tratamiento (B); secuencias de DNA con tratamiento con bisulfito (C); secuencias consenso de DNA de cada panel (D). La flecha indica el sitio de metilación en cada panel; y en D los están encerrados en un cuadrado.

Se observó que el número de citocinas en cada una de las muestras varió entre 336 y 343 residuos, de estos entre 27 y 28 fueron dinucleótidos CpG (7.87%-8.24%), el contenido del dinucleótido CpT varió entre 69 a 71 residuos (20.47%-21.30%), el contenido del dinucleótido CpA se observó en un rango de entre 113 a 117 residuos (33.12%-34.82%) y el contenido del dinucleótido CpC de entre 122 a 131 dinucleótidos presentes por muestra (36.31%-38.19%). Cuando se compararon las secuencias con y sin tratamiento de bisulfito de identificó que la cantidad de citocinas metiladas osciló entre 44 y 62 (13.02%-18.24%), de los cuales entre 0 a 4 citocinas metiladas fueron observadas en residuos del dinucleótido CpG, que represento entre un 0% a un 14.81% de los sitios CpG metilados; para el dinucleótido CpT se identificaron entre 6 a 16 sitios metilados en las muestras analizadas, lo que representó entre 8.45% y 22.54% de los CpT; se observaron de entre 13 a 20



dinucleótidos CpA metilados, lo que represento de un 9.6% a un 17.9% de los residuos CpA; mientras que para el dinucleótido CpC se observaron de entre 18 a 29 dinucleótidos metilados, que representó de un 12.2% a un 23.02% de los residuos de CpC (Tabla 12).

**Tabla 237.** Contenido de dinucleótidos totales y metilados de cada una de las muestras, así como su frecuencia correspondiente.

M Hg	Total, de cada uno de los dinucleótido CpN / Total de residuos CpN <sub>T</sub>										Cada dinucleótido metilado / Total correspondiente de cada dinucleótido.									
	CpG <sub>T</sub>		CpT <sub>T</sub>		CpA <sub>T</sub>		CpC <sub>T</sub>		CpN <sub>T</sub>	mCpG		mCpT		mCpA		mCpC		mCpN		
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
CRS H2	27	8.06	71	21.19	114	34.03	123	36.72	335	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
WS4 A2	27	8.04	69	20.54	114	33.93	126	37.50	336	1	3.70	7	10.14	17	14.91	29	23.02	54	16.07	
WS7 A2	27	8.01	71	21.07	115	34.12	124	36.80	337	1	3.70	10	14.08	14	13	24	19.4	49	14.54	
WS15 A2	27	7.99	72	21.30	114	33.73	125	36.98	338	2	7.41	11	15.28	17	14.9	23	18.4	53	15.68	
WS20 A2	27	8.01	69	20.47	114	33.83	127	37.69	337	3	11.11	9	13.04	14	12.3	19	15	45	13.35	
WS47 A2	27	7.99	70	20.71	114	33.73	127	37.57	338	3	11.11	12	17.14	11	9.6	18	14.2	44	13.02	
WS89 A2	27	8.01	70	20.77	114	33.83	126	37.39	337	0	0.00	8	11.43	17	14.9	20	15.9	45	13.35	
WS93 A2	27	8.04	69	20.54	114	33.93	126	37.50	336	1	3.70	7	10.14	17	17.9	29	23	54	16.07	
WT4 A2	27	8.01	69	20.47	114	33.83	127	37.69	337	3	11.11	9	13.04	14	12.3	19	15	45	13.35	
WT6 A2	27	8.04	69	20.54	114	33.93	126	37.50	336	1	3.70	7	10.14	17	17.9	29	23	54	16.07	
WT20 A2	27	8.01	70	20.77	114	33.83	126	37.39	337	2	7.41	7	10.00	15	13.2	27	21.4	51	15.13	
WT34 A2	27	8.01	71	21.07	115	34.12	124	36.80	337	2	7.41	12	16.90	14	12.2	25	21.2	53	15.73	
WT51 A2	27	8.01	71	21.07	115	34.12	124	36.80	337	0	0.00	10	14.08	15	13	24	19.4	49	14.54	
WT80 A2	27	7.99	72	21.30	114	33.73	125	36.98	338	2	7.41	11	15.28	17	14.9	23	18.4	53	15.68	
WT89 A2	27	8.01	69	20.47	114	33.83	127	37.69	337	3	11.11	9	13.04	14	12.3	19	15	45	13.35	
WT104 A2	27	7.99	70	20.71	114	33.73	127	37.57	338	3	11.11	12	17.14	11	9.6	18	14.2	44	13.02	
WS96 A2	27	7.87	71	20.70	115	33.53	130	37.90	343	2	7.41	9	12.68	20	17.4	27	20.8	58	16.91	
WS24 A2	27	7.99	70	20.71	114	33.73	127	37.57	338	2	7.41	12	17.14	13	11.4	19	15	46	13.61	
WS31 A2	27	8.04	70	20.83	114	33.93	125	37.20	336	3	11.11	13	18.57	16	14	25	20	57	16.96	
WS63 A2	27	7.99	70	20.71	114	33.73	127	37.57	338	2	7.41	12	17.14	13	11.4	19	15	46	13.61	
WS72 A2	27	8.04	70	20.83	114	33.93	125	37.20	336	3	11.11	13	18.57	16	14	25	20	57	16.96	
WT31 A2	27	7.99	70	20.71	114	33.73	127	37.57	338	2	7.41	12	17.14	13	11.4	19	15	46	13.61	
WT69 A2	27	8.04	70	20.83	114	33.93	125	37.20	336	3	11.11	13	18.57	16	14	25	20	57	16.96	
WS40 B2	27	7.87	72	20.99	113	32.94	131	38.19	343	1	3.70	15	20.83	14	12.4	25	19.1	55	16.03	
WS50 B2	27	7.87	72	20.99	113	32.94	131	38.19	343	1	3.70	15	20.83	14	12.4	25	19.1	55	16.03	
WS16 B2	27	7.92	71	20.82	113	33.14	130	38.12	341	3	11.11	14	19.72	16	14.2	26	20	59	17.30	
WT19 B2	27	7.92	71	20.82	113	33.14	130	38.12	341	3	11.11	14	19.72	16	14.2	26	20	59	17.30	
WS2 B4	27	7.92	71	20.82	114	33.43	129	37.83	341	1	3.70	14	19.72	15	13.2	22	17.1	52	15.25	

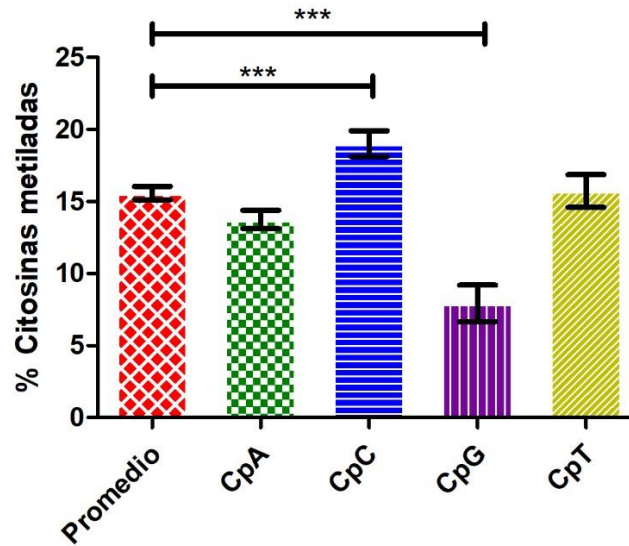


Continuación Tabla.....

M	Hg	Total, de cada uno de los dinucleótidos CpN Total de residuos CpN <sub>T</sub>									Cada dinucleótido metilado/Total correspondiente de cada dinucleótido									
		CpG <sub>T</sub>		CpT <sub>T</sub>		CpA <sub>T</sub>		CpC <sub>T</sub>		CpN <sub>T</sub>	mCpG		mCpT		mCpA		mCpC		mCpN	
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
WS7	B4	27	7.92	71	20.82	114	33.43	129	37.83	341	1	3.70	14	19.72	15	13.2	22	17.1	52	15.25
WS4	B4	27	7.87	71	20.70	114	33.24	131	38.19	343	3	11.11	12	16.90	15	13.2	21	16	51	14.87
WS7	B4	27	7.94	71	20.88	114	33.53	128	37.65	340	4	14.81	16	22.54	17	14.9	25	19.5	62	18.24
WT2	B4	27	7.92	71	20.82	114	33.43	129	37.83	341	0	0.00	14	19.72	15	13.2	22	17.1	51	14.96
WT3	B4	27	7.87	71	20.70	114	33.24	131	38.19	343	3	11.11	12	16.90	15	13.2	21	16	51	14.87
WT4	B4	27	7.94	71	20.88	114	33.53	128	37.65	340	4	14.81	16	22.54	17	14.9	25	19.5	62	18.24
WS1	C1	27	7.96	71	20.94	116	34.22	125	36.87	339	3	11.11	11	15.49	17	14.7	29	23.4	60	17.70
WS5	C1	27	8.04	70	20.83	117	34.82	122	36.31	336	3	11.11	10	14.29	14	12	27	22.1	54	16.07
WS9	C1	27	8.01	70	20.77	116	34.42	124	36.80	337	3	11.11	11	15.71	17	14.7	29	23.4	60	17.80
WT1	C1	27	8.04	70	20.83	117	34.82	122	36.31	336	3	11.11	10	14.29	14	12	27	22.1	54	16.07
WT3	C1	27	7.96	71	20.94	116	34.22	125	36.87	339	3	11.11	11	15.49	17	14.7	29	23.4	60	17.70
WT5	C1	27	8.04	70	20.83	117	34.82	122	36.31	336	3	11.11	10	14.29	14	12	27	22.1	54	16.07
WS5	D1	27	7.94	70	20.59	117	34.41	126	37.06	340	2	7.41	8	11.43	21	17.2	25	19.8	56	16.47
WS7	D1	28	8.24	71	20.88	116	34.12	125	36.76	340	2	7.14	6	8.45	18	17.2	25	19.8	51	15.00
WT5	D1	27	7.94	71	20.88	116	34.12	126	37.06	340	0	0.00	8	11.27	20	17.2	25	19.8	53	15.59

CRS, secuencia de referencia de Cambridge; Hg, Haplogrupo; CpG<sub>T</sub>, total de dinucleótido citosina fósforo guanina; CpT<sub>T</sub>, total de dinucleótido citosina fósforo timina; CpA<sub>T</sub>, dinucleótido total, citosina, fósforo, adenina; CpC<sub>T</sub>, dinucleótido total citosina citosina fósforo; CpN<sub>T</sub>, CpG<sub>T</sub> + CpT<sub>T</sub> + CpA<sub>T</sub> + CpC<sub>T</sub>; mCpG, citosina fosforosa guanina metilada; mCpT, citosina metilada, fósforo, timina; mCpA, citosina fosforosa adenina metilada; mCpC, citosina metilada, citosina de fósforo; mCpN, mCpG + mCpT + mCpA + mCpC; N, número de muestras. M, muestra.

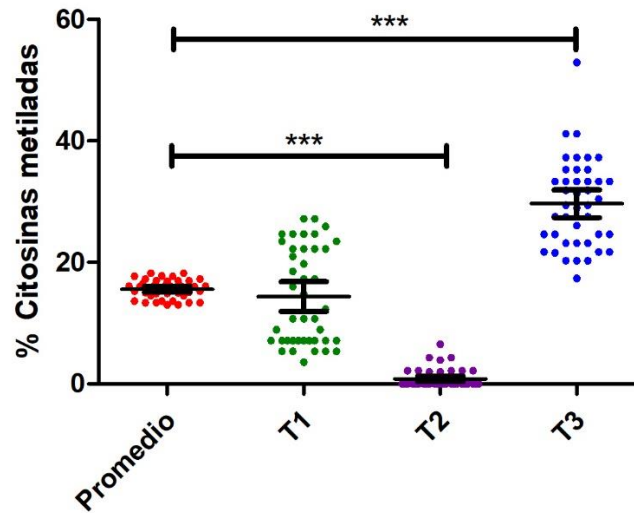
La frecuencia de distribución de metilación se analizó en las 42 muestras para determinar si había diferencias entre los dinucleótidos CpA, CpC, CpT o CpG, en cada región y entre las regiones del D-loop del genoma mitocondrial, mediante el análisis de la prueba estadística ANOVA con una p=0.001. En la Figura 21 se muestra el porcentaje de metilación promedio de las 42 muestras de 15.52%, y el porcentaje de metilación promedio para CpA, CpC, CpG y CpT de 13.74%, 19.02%, 15.73% y 7.93%, en las muestras respectivamente. Además, el valor de para CpC y CpG de las muestras en comparación con la frecuencia promedio, mostró un cambio estadísticamente significativo (p = 0.001; Figura 21).



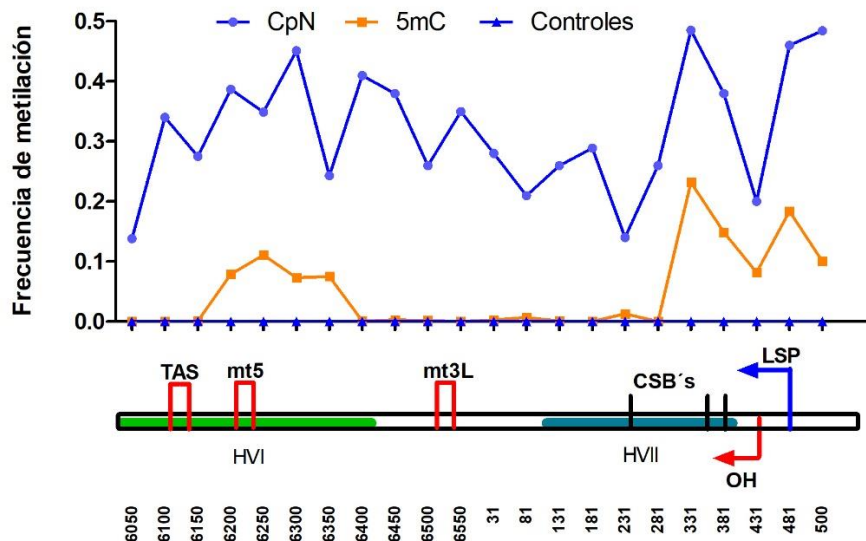
**Figura 21.** Porcentaje del promedio y de los dinucleótidos CpA, CpC, CpG y CpT. Se muestra la desviación estándar y el cambio estadísticamente significativo \*\*\* ( $p=0.001$ ).

La frecuencia de distribución de metilación se analizó en las muestras para determinar si existe alguna diferencia entre las regiones después de dividir la región D-loop en T1, T2 y T3. Estas diferencias fueron determinadas por el análisis estadístico ANOVA con valores considerados estadísticamente significativos de  $p=0.001$ . Los resultados mostraron valores estadísticamente significativos en las regiones T2 y T3, en comparación con la metilación promedio de 15.52% (Figura 22). Los porcentajes de metilación en los fragmentos T1, T2 y T3 fueron 14.34%, 8.07% y 29.65%, respectivamente. La región T1 del nucleótido 16151 al nucleótido 16350 y la región T3 del nucleótido 282 al nucleótido 500 contenían la mayor densidad de citosinas metiladas, que son sitios donde se encuentran algunos de los elementos reguladores del mtDNA (Figura 23).





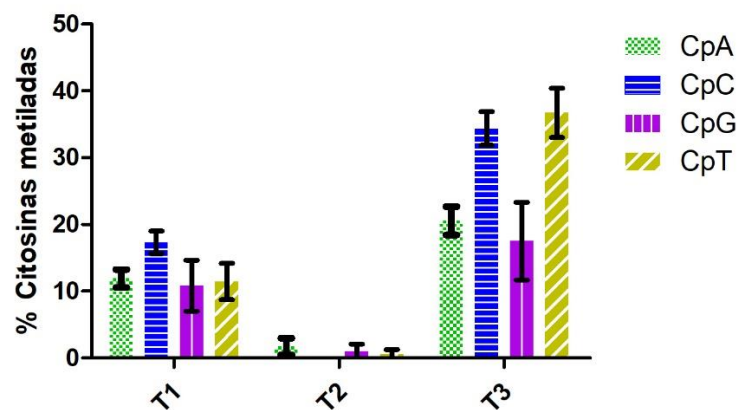
**Figura 22.** Frecuencia y distribución de la metilación en la región D-loop del mtDNA. \*\*\* muestra la desviación estándar; estadísticamente significativo  $p = 0.001$ .



**Figura 23.** Representación esquemática de la distribución de frecuencia de la metilación del mtDNA en la región D-loop. HVI y HVII están representados en verde y azul, respectivamente; los elementos reguladores se muestran de la siguiente manera: OH, origen de replicación de la cadena pesada; CSBI, CSBII y CSBIII, bloques de secuencia conservada I, II y III respectivamente; TAS, secuencia asociada a la terminación; LSP, promotor de cadena ligera; mt5, elemento de control y mt3L, elemento de control de cadena L.



El porcentaje de metilación por región de CpA, CpC, CpG y CpT se calculó para determinar si existe alguna diferencia significativa entre las regiones CpA, CpC, CpG y CpT mediante el uso de la prueba de significación ANOVA. La Figura 24 muestra el porcentaje promedio de metilación para CpA= 11.9%, CpC= 17.3%, CpG= 10.8% y CpT= 11.4% en T1; CpA= 1.7%, CpG= 0.9%, CpT= 0.5%, y CpC= 0% en T2; y CpA= 20.5%, CpC= 34.3%, CpG= 17.5% y CpT= 36.7% en T3 (Figura 24).



**Figura 24.** Porcentaje y distribución de la metilación en CpA, CpC, CpG y CpT en la región D-loop del mtDNA. Muestra los valores promedio de la frecuencia de metilación en las tres zonas de las 42 muestras analizadas en este estudio.

## 6.6 Asociación del perfil de metilación y CaMa.

Se analizó la asociación de los sitios de metilación de la región D-loop del mtDNA, en el análisis de asociación ningún sitio mostro una asociación estadísticamente significativa. Sitios como: 303, 305, 343, 382, entre otros mostraron ligera tendencia a actuar como factores de protección ya que se observó un OR menores a uno. En especial en la metilación de la posición 303 del mtDNA se observó una mayor tendencia a estar actuando como un factor de protección ya que se observó un OR de 0.464, con un IC 95% (0.25-084) con un valor p de 0.014. Si bien esta tendencia se identificó con el análisis de 42 muestras, este sitio de metilación podría confirmarse al analizar la asociación de riesgo con todas las muestras que se tienen disponibles y que están en espera de ser secuenciadas.



## VII Discusión.

El CaMa es la neoplasia con mayor incidencia y mortalidad tanto a nivel mundial como en nuestro país. Se sabe que el CaMa es una enfermedad multifactorial, entre los que se encuentran factores ambientales, el estilo de vida como y geográficos que pueden contribuir al desarrollo de la neoplasia. En al presente trabajo analizamos e identificamos variantes asociadas al CaMa como: haplogrupo, edad, estado físico o polimorfismos del mtDNA, que se han reportado como posibles factores de riesgo a CaMa.

La edad de las mujeres que donaron su tejido fue entre 33 a 82 años, siendo el grupo más representativo las mujeres con una edad igual o mayor a 55 años con 162 pacientes (57.45%), algo que ya ha sido reportado para poblaciones europeas y asiáticas [11, 14]. Se observó que solo 43 pacientes (15.24%) tenían un IMC normal (menor a 25) mientras que 239 (84.76%) fueron catalogadas desde sobrepeso hasta obesidad mórbida. Esto es relevante ya que se la obesidad se ha reportado como factor de riesgo en CaMa y una variedad de patologías [9]

Respecto a la frecuencia y presencia de los haplogrupos, observamos que el HgA fue el más representativo, tanto en el grupo de controles como el de pacientes, con un 44% y 62% respectivamente, algo esperado ya que previamente se ha reportado que en población mexicana el HgA es el más frecuente [69, 72]. Además, identificamos los haplogrupos amerindios B, C y D, así como los haplogrupos L de origen africano; U y K de origen europeo; M y G de origen asiático.

Asociamos el papel de los Hg en el desarrollo del CaMa en la población analizada, observamos que el subHgA2 está actuando como un factor de riesgo a CaMa al presentar un OR de 2,12, con un IC de entre 1,28 a 3.35 y con un valor de  $p=0.003$ , ésta asociación del Hg con CaMA se ha reportado diferentes poblaciones. Por ejemplo, en población polaca demostraron que los Hg I y H, son factor de riesgo para esta enfermedad [30]. Se ha reportado en población italiana y polaca los Hg X y H, son haplogrupos significativamente más frecuentes en sujetos con mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*. Recientemente se observó que el Hg T1a1 puede



modificar el riesgo individual de adquirir la enfermedad en portadores de mutaciones en *BRCA2* [9]. El Hg N, es un factor de riesgo para CaMa, particularmente en mujeres de origen afroamericano e indio [46] Además, Bai *et al* [34], demostraron que en población caucásica el Hg K aumentaba el riesgo de CaMa, encontraron una asociación entre la distribución del Hg N y la incidencia de CaMA esporádica.

En contraste, observamos que el subHgB4 funciona como factor de protección para la población analizada, debido que su valor de OR fue de 0.0637, con un IC de entre 0.27 a 0.14, con un valor de  $p=0.0001$ , un papel que ya se había reportado en los Hg U, H y T1a1 en diferentes poblaciones. [30, 34, 47]. Analizamos las variantes C16207T, T16519C, T239C y A263G, que se asocian frecuentemente como factores de riesgo a CaMa; y las variantes T16183C, C16223T, T16362C, A73G y C150T, que están enriquecidas en los controles en comparación con los pacientes con CaMa, lo que sugiere que podrían proteger contra CaMa [12, 27, 34, 35], sin embargo, no observamos alguna asociación de estas variantes a CaMa en la población analizada. Se identificó que la variante T16189C, actúa como factor de protección para la población que analizamos con un OR de 0.3802, un IC de entre 0,225 y 0.641, con un valor de  $p=0.0004$ , algo que contrasta con los reportes en las poblaciones china y polaca en donde se asocia como factor de riesgo [30, 38]. Esta yuxtaposición en los resultados que observamos en la variante T16189C, puede ser debido a las diferencias en el estilo de vida y la diferencia en los Hg que se reportaron, ya que nosotros lo estamos identificando como factor de protección asociado a HgB en poblaciones chinas y polacas, se ha asociado en Hg M y H respectivamente.

Complementariamente, en este trabajo desarrollamos un nuevo enfoque para identificar los sitios de metilación en el mtDNA basado en la RT-PCR bisulfite sequencing, esta nueva aproximación para identificar los sitios de metilación en la región D-loop del mtDNA fue publicado y el artículo se puede observar en el Anexo 2 [73]. Interesantemente, observamos que la mayor densidad de citosinas metiladas se distribuyó en dos regiones principales que van de 282 a 500 y de 16151 a 16350,



estas regiones contienen elementos esenciales de transcripción y replicación. Estos resultados están de acuerdo con sugerencias anteriores, que han asociado la metilación con un papel en la regulación de la transcripción [56, 65]. La figura 23 describe estas dos regiones con más detalle. Estas regiones contienen los siguientes elementos reguladores: la secuencia asociada al terminador (TAS) y el elemento de control (mt5), dentro de las posiciones de nucleótidos 16081-16138 y 16194-16208 respectivamente, que están cerca o en la región (16151-16350), con frecuencias de metilación más altas con un promedio de 0.084; el origen de la cadena H (OH), los bloques de secuencia conservada I, II y III (CSBI, CSBII y CSBIII), y el promotor de la cadena ligera (LSP) que están dentro de las posiciones de nucleótidos 110-441, 213-224, 299-314, 346-361 y 392-445 respectivamente, con una frecuencia promedio de 0.10 de las citosinas metiladas dentro de las posiciones de nucleótidos de 182-500. Las regiones 16000-16150 y 16351-181 contenían las regiones de metilación más bajas y solo un elemento regulador. Esta observación respalda la idea de que la unión de las proteínas mitocondriales, como el factor de transcripción A (TFAM), la proteína de unión al DNA monocatenaria (mtSSB) y las polimerasas B y  $\gamma$  (Polg B y Pol  $\gamma$ ), en regiones no metiladas regulan la transcripción y la replicación de mtDNA [25]; de manera similar, que en el genoma nuclear [48, 49, 63, 67].

Los resultados de este estudio concuerdan con los reportes de Bianchessi *et al.* [56], quienes observaron citosinas metiladas entre los nucleótidos 171 al 323, lo que aumenta la síntesis del 7S mtDNA. Por lo anterior, la metilación del mtDNA podría influir en la replicación y expresión del genoma mitocondrial, que ya había sido hipotetizado previamente por Bellizzi *et al.* [57]. Cabe señalar, que la posición del 7S mtDNA es en el sitio 16106-191, que se superpone con la región que contiene la frecuencia más baja de metilación, de 16401 a 231, probablemente debido a la importancia del 7S mtDNA y a muchas otras funciones dentro de las mitocondrias, lo que muestra que los resultados de este estudio, son comparables con otro estudio que utiliza un enfoque diferente [48, 49, 63, 67].



---

## VIII Conclusiones.

- Se observó que el Sub Hg A2 pudiera estar actuando como un factor de riesgo, mientras que Sub Hg B4 como un factor de protección en las muestras analizadas.
- Identificamos 133 variaciones en el mtDNA, pero solo la variante T16189C se asoció como un factor de protección en la población analizada.
- Desarrollamos un nuevo enfoque basado en RT-PCR bisulfite sequencing para identificar el perfil de metilación en la región D-loop del mtDNA , el cual es más rápido, barato y reproducible, comparado con la metodología existente.
- Identificamos que la mayor frecuencia de metilación se encuentra en HVI y HVII, donde se encuentran regiones reguladoras de la expresión del mtDNA.



---

## IX Perspectivas.

- Colectar un mayor número de muestras.
- Identificar el perfil de metilación de las muestras recolectadas y determinar si existe una asociación entre dicho perfil y el cáncer de mama.



## X Anexos.

### Anexo 1

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN:

#### **“Evaluación del estado de metilación del mtDNA en cáncer de mama de mujeres mexicanas.”**

##### 1. Información sobre el estudio.

Se le invita a formar parte de un proyecto de investigación, en el cual se requiere la participación de personas afectadas con cáncer de mama en diferentes etapas de su enfermedad. El proyecto consiste en identificar pequeños cambios (metilación de mtDNA) entre las células afectadas con cáncer y las células sanas (sin cáncer) que no se pueden ver a simple vista.

El determinar si existen cambios o no entre los dos tipos de células no ayudara directamente a su tratamiento, pero proporcionara nueva información para que los médicos e investigadores tengan un mejor entendimiento sobre la enfermedad. Además, en el futuro los resultados de esta investigación pudieran favorecer el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico y/o tratamiento.

La participación de usted en el proyecto es voluntaria y consistirá en la donación de fragmentos de tejido mamario que serán obtenidos de la pieza quirúrgica obtenida durante parte de su tratamiento para cáncer de mama, así como de una muestra de sangre periférica.

##### 2. Procedimiento.

Las muestras de tejido se obtendrán de la pieza quirúrgica que será extirpada en la cirugía que usted y su médico tratante haya decidido realizar como parte de su tratamiento. La muestra de sangre se tomará en cuanto usted acepte participar en este estudio.

##### a. Riesgos:

Respecto a las muestras de tejido, estas serán tomadas del tejido extraído después del procedimiento quirúrgico, por lo cual no implica riesgo adicional al informado por su médico oncólogo respecto a su tratamiento. En cuanto a la muestra de sangre, son exclusivos de la punción venosa y se refiere a la necesidad de punción en más de una ocasión en casos excepcionales. También puede desarrollarse hematoma (moreton), mismo que se resuelve en forma espontánea.

##### b. Beneficios.

Aunque los resultados que se obtengan en este protocolo de investigación no beneficiaran directamente su diagnóstico y/o tratamiento, si podrán aportar información útil para que los médicos e investigadores tengan un mejor entendimiento de esta enfermedad y en un futuro se pueden desarrollar nuevas pruebas diagnósticas y tratamientos para combatir el cáncer de mama.

##### 3. Confidencialidad.

La información que usted proporcione, así como los registros clínicos y/o de hospital será tratada como privilegiada y confidencial; por lo cual, solo personal previamente autorizado por el responsable del proyecto podrá tener acceso a ella, pero esta no





será divulgada o revelada a ninguna persona externa al grupo de trabajo. Toda su información será destruida cinco años después de concluir el estudio.

Los resultados que se obtengan de la investigación podrán ser publicados en artículos de revistas científicas, congresos, coloquios, entre otros. Sin embargo sus datos personales no serán revelados bajo ningún motivo.

#### **4. Participación / suspensión.**

Su participación en este estudio es voluntaria. El rehusarse a participar en la investigación no afectará en ningún momento la atención médica proporcionada por el instituto. Además, usted podrá retirarse del estudio en el momento que lo desee. Las muestras de tejido y sangre serán utilizadas de manera adecuada y conforme a lo establecido en los protocolos de uso de residuos biológico-infecciosos.

#### **5. Colección de material biológico:**

(  ) Autorizó que se utilicen fragmentos de tejido de la pieza quirúrgica mamaria y muestra de sangre periférica para la realización exclusiva de este estudio.

(  ) Autorizó que se utilicen fragmentos de tejido de la pieza quirúrgica mamaria y muestra de sangre periférica para la realización de este estudio y otros estudios futuros.

#### **6. Contacto Comité de ética**

En caso de requerir más información o tener alguna duda respecto a su participación y derechos, puede comunicarse con el Comité de ética del IMSS al teléfono 56276900 extensión 21216 y/o al correo electrónico [conise@cis.gob.mx](mailto:conise@cis.gob.mx).

#### **7. Consentimiento.**

El Dr. Normand García Hernández, reconoce el compromiso que implica solicitar su participación en la investigación, por lo que se le solicita su firma en esta carta de consentimiento informado, en donde se le explican a usted los por menores del estudio. Además, ha tenido la oportunidad de hacer preguntas y se la han contestado de manera adecuada y a su entera satisfacción. Se la ha entregado una copia del presente consentimiento informado y en caso de tener dudas deberá comunicarse al teléfono 56 27 69 41 y/o acudir personalmente a la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana en el Hospital de Pediatría del CMN SXXI del IMSS con el responsable del proyecto.



Al firmar este documento, usted accede voluntariamente a participar en este estudio.

Lugar: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

Firma del paciente: \_\_\_\_\_

Nombre del testigo: \_\_\_\_\_

Firma del testigo: \_\_\_\_\_

Nombre del testigo: \_\_\_\_\_

Firma del testigo: \_\_\_\_\_

Laboratorio de Genética Molecular, Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, 06725 México, D.F., México. Tel. 56 27 69 00 ext. 21941; E.mail [normand.garcia@imss.gob.mx](mailto:normand.garcia@imss.gob.mx)



## RESEARCH ARTICLE

## A New Approach to Identify the Methylation Sites in the Control Region of Mitochondrial DNA

Ashael Alfredo Pérez-Muñoz<sup>1</sup>, María de Lourdes Muñoz<sup>1\*</sup>, Normand García-Hernández<sup>2\*</sup> and Heriberto Santander-Lucio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics and Molecular Biology, Research and Advanced Studies Center of National Polytechnic Institute (CINVESTAV of IPN), Mexico City, Mexico; <sup>2</sup>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), Mexico City, Mexico

**Abstract:** Mitochondrial DNA (mtDNA) methylation has the potential to be used as a biomarker of human development or disease. However, mtDNA methylation procedures are costly and time-consuming. Therefore, we developed a new approach based on an RT-PCR assay for the base site identification of methylated cytosine in the control region of mtDNA through a simple, fast, specific, and low-cost strategy. Total DNA was purified, and methylation was determined by RT-PCR bisulfite sequencing. This procedure included the DNA purification, bisulfite treatment and RT-PCR amplification of the control region divided into three subregions with specific primers. Sequences obtained with and without the bisulfite treatment were compared to identify the methylated cytosine dinucleotides. Furthermore, the efficiency of C to U conversion of cytosines was assessed by including a negative control. Interestingly, mtDNA methylation was observed mainly within non-C-phosphate-G (non-CpG) dinucleotides and mostly in the regions containing regulatory elements, such as OH or CSBI, CSBII, and CSBIII. This new approach will promote the generation of new information regarding mtDNA methylation patterns in samples from patients with different pathologies or that are exposed to a toxic environment in diverse human populations.

## ARTICLE HISTORY

Received: December 28, 2019  
Revised: April 13, 2020  
Accepted: April 15, 2020

DOI:  
10.2174/1566524020666200528154005

**Keywords:** Mitochondrial epigenetics, bisulfite sequencing, methylation, mitochondrial DNA, D-loop.

### 1. INTRODUCTION

The function of mitochondria is the production of energy for the maintenance of cellular homeostasis [1]; metabolic routes ( $\beta$ -oxidation of fatty acids, tricarboxylic acids or the urea cycle); control of intracellular  $\text{Ca}^{+2}$ , ionic homeostasis, biosynthesis of steroid hormones, and regulation of cell fate by integrating multiple signals of cell death [2-4]. This cellular organelle contains its own genetic material, and human mitochondrial DNA (mtDNA), is a double-stranded circular DNA molecule of 16,569 bases that

contains 37 encoded genes, 2 ribosomal RNAs (12S and 16S rRNAs), 22 transfer RNAs (tRNA) and 13 polypeptides that are involved in oxidative phosphorylation (OXPHOS) [1]. MtDNA also contains a noncoding region, called the displacement-loop (D-Loop), which has approximately 1.2 Kb and comprises two hypervariable regions (HVI and HVII), along with the origin of the heavy chain replication (OH), the promoter for the transcription of the heavy chain (HSP) and the light chain (LSP), which are the regulatory elements of mtDNA replication and transcription [3].

It is known that different mutations in mtDNA are involved in physiological events, such as thermogenesis, production of reactive oxygen species (ROS), aging, cellular differentiation, and pathological phenotypes, which include neurodegenerative diseases, diabetes, metabolic syndrome, or cancer [5-8]. Furthermore, the existence of epigenetic regulation in mtDNA has also been reported [9].

The mitochondria play an important role in the cell and in the maintenance and regulation of epigenetics by producing *s*-adenosylmethionine (SAM), which is considered to be the universal methyl donor. DNA

\*Address correspondence to these authors at the Department of Genetics and Molecular Biology, Research and Advanced Studies Center of National Polytechnic Institute (CINVESTAV of IPN), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, San Pedro Zacatenco, C.P. 07360, Mexico City, Mexico; Tel: 52-5557-3800; E-mail: [lmunoz@cinvestav.mx](mailto:lmunoz@cinvestav.mx)

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, Col. Doctores, 06725, Mexico City, Mexico; Tel: 52-5527-6945; E-mail: [normandgarcia@gmail.com](mailto:normandgarcia@gmail.com)



Methylation is a heritable epigenetic marker, which comprises the covalent transfer of a methyl group to the C-5 position of the cytosine ring (5mC) of DNA by DNA methyltransferases (DNMT1, DNMT3a, and DNMT3b) [10-12] on CpG dinucleotides. In mammalian genomes, DNA methylation occurs nearly exclusively within CpG dinucleotides (70-80%) in repetitive sequences, gene bodies, and intergenic regions. The remaining unmethylated CpG sites mostly occur in dense clusters referred to as CpG islands, and that is why the CpGs are conserved through evolution [13]. The abundance of CpG dinucleotides in nuclear DNA (nDNA) is 9.5%, which is much lower than expected based on the GC [14].

MtDNA has a low proportion of CpG dinucleotides (5.25%; [15]) compared with that of nuclear DNA (nDNA; 9.5%; [14]). Recently, it was reported that in the mitochondria, not only the cytosines at the CpG can be methylated but also all of the 5182 cytosine residues of mtDNA have the potential to be methylated [16, 17]. In addition, the DNA methyltransferase DNMT1-isoform 3 (DNMT1iso3) methylates the mtDNA genome [18] and DNMT3a localizes in the mitochondria [19]. Furthermore, Yu *et al.*, [20] observed that when DNMT1, DNMT3a, or DNMT3b was knocked down in human fetal heart mesenchymal stem cells, mtDNA methylation diminished, although the specific molecular mechanisms have not yet been defined [20]. It also has been shown that feeding pigs with betaine-supplemented diets during the course of gestation significantly upregulated the expression of mtDNA-encoded OXPHOS genes ( $p < 0.05$ ), including COX1, COX2, and ND5, in the muscle of newborn piglets [21]. All of these previous results strongly suggest that methylation of mtDNA plays a role as a regulator of metabolism through the regulation of DNA transcription, similar to the regulation of nuclear DNA transcription through methylation [22].

The methylation of the mitochondrial genome has had relevance in the past decade due to its association with several diseases of clinical importance [15], which vary in the methylated cytosine sites according to protein intake, the exposure of pollutants, and diseases such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and Alzheimer's disease [23-26]. Methylation of mtDNA in hyperglycemia, after diabetes damages retina, is altered in cells by negatively regulating the mitochondrial gene expression, which causes blindness [27]. This finding suggests that mtDNA epigenetics play an important role in mitochondrial expression and function and, therefore, have the potential to be used as diagnostic or prognostic epigenetic markers and possibly as new therapeutic targets. The specific methylation profiles of mtDNA data that are available at present are too scarce to be associated with any specific disease.

The aim of this study was to develop a new procedure for sequencing the bisulfite DNA that is treated for the identification of methylated cytosines in the D-loop region of mtDNA to reduce the operating costs and the time required to develop the procedure.

This work is important because, in this region of mtDNA, the regulatory elements of transcription and replication are located.

## 1. MATERIALS AND METHODS

### 1.1. Samples

A total of 20 samples from breast tissue were obtained from the Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Ginecología y Obstetricia No 3, Centro Médico Nacional "La Raza" from the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) registered in the project with number R-2015-785-016 and R-2017-785-071 and approved by the ethics committee of the National Committee for Scientific Research (CNIC) from the IMSS. All data have been kept in strict confidentiality, as indicated by national and international regulations. The tests were carried out following the rules established in the Helsinki agreement. All the participants were duly informed and provided their written consent for each of the procedures.

### 2.2 DNA Extraction

DNA was extracted from 20 samples of breast tissue by DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's standard protocol. There was no difference in the results of this study, when the RNase A solution step was included in the protocol of DNA purification by this kit. DNA concentrations were measured by NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA). Each sample was eluted with the EB elution buffer (Qiagen, USA), and a final concentration of 25 ng/ $\mu$ l was obtained by dilution with the same buffer.

### 2.3. PCR Amplification and Sequencing of mtDNA

The entire mtDNA D-loop region (1,061 bp) was amplified by PCR using specific primers [28]. Shortly, all reactions were carried out in a 30  $\mu$ l final reaction volume composed of one unit of the high-fidelity polymerase (Jena Bioscience, Germany), 0.5  $\mu$ l of L15811 primer (5'-TCATTGGACAAGTAGCATCC-3'; 20 pmoles/ $\mu$ l), 0.5  $\mu$ l of H775 primer (5'-AGGCTAAGCGTTTTGAGCTG-3'; 20 pmoles/ $\mu$ l) [28], 0.5  $\mu$ l of dNTP mix (Jena Bioscience, Germany; an equimolar mixture of 10 mM dATP, dCTP, dGTP and dTTP), and 40 ng of template DNA. The thermal profile used for the reaction included 3 min heat activation of the enzyme at 95°C, followed by 35 cycles of denaturation at 95°C per 40 s, with an annealing temperature 58°C per 40 s, and an extension at 68°C per 90 s, then one cycle at 68°C per 5 min. The obtained PCR products were purified by the Sap-Exo Kit (Jena Bioscience, Germany) according to the manufacturers. The purified products were sequenced (forward and reverse) by automated sequencing in an ABI PRISM 3100 with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) using the specific primers L15811, H11, L16491 (5'-GAGTGGTTAATAGGGTGATAG-3'), and H775 (5'-CACCATTAGCACCCAAAGCT-3').



### 2.3. Haplogroup Determination of mtDNA

To determine the mtDNA haplogroup, the sequences obtained from each sample were assembled with Bioedit software (Ibis Therapeutics, USA); once assembled, they were aligned and compared with the Cambridge reference sequence (CRS), to identify the polymorphisms of each of the samples and the haplogroup was determined. Furthermore, the subhaplogroups were identified according to the classification scheme described by Kumar *et al.*, [29] and confirmed by Mitomaster [30].

### 2.4. Bisulfite Treatment Controls Representing Demethylated mtDNA Fragments

To obtain the DNA controls without methylation [31], a PCR of the D-loop region was performed with specific primers [28]. All the reactions were carried out in a 30  $\mu$ l final reaction volume composed of one unit of high-fidelity polymerase (Jena Bioscience, Germany), 0.5  $\mu$ l of L15811 primer (20 pmoles/ $\mu$ l), 0.5  $\mu$ l of H775 primer (20 pmoles/ $\mu$ l) [28], 0.5  $\mu$ l of dNTP mix (Jena Bioscience, Germany; equimolar mixture of 10 mM dATP, dCTP, dGTP and dTTP), and 40 ng of template DNA. The thermal profile used for the reaction included 3 min heat activation of the enzyme at 95°C, followed by 35 cycles of denaturation at 95°C per 40 s, with an annealing temperature 58°C per 40 s, and an extension at 68°C per 90 s, then one cycle at 68°C per 5 min. The obtained PCR products were purified by the Sap-Exo Kit (Jena Bioscience, Germany) according to the manufacturers, and after the DNA concentration was measured by NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA), PCR amplicons were stored at -70°C for their future use as controls for DNA bisulfite conversion.

### 2.5. Bisulfite Treatment

The bisulfite conversion of each DNA sample was performed by the EZ DNA Methylation Gold Kit (Zymo Research, USA) to ensure that cytosine conversion was complete, according to the manufacturer's protocol. Because the use of standard PCR amplification techniques erases methylation patterns, a conversion control based on the C-to-U conversion of cytosines, to assess bisulfite conversion efficiency was included, which consisted of bisulfite treatment of the DNA after amplification (as mentioned above) followed by sequencing. To perform the conversion first, 130  $\mu$ l of the CT Conversion Reagent and enough water to reach a final volume of 150  $\mu$ l were added in a 200  $\mu$ l tube containing 450 ng of temple DNA or DNA without methylated cytosines (conversion control). The mixtures were incubated in a thermal cycler. The thermal profile used for the incubation included 10 min heat at 98°C, followed by incubation at 53°C per 30 min and eight cycles of incubation at 53°C per 6 min, followed by a second incubation at 37°C per 30 min. After the bisulfite treatment, the DNA was purified. The treated DNA was purified by placing 600  $\mu$ l M-binding buffer in the Zymo-Spin IC column, followed by the addition of the bisulfite reaction (150  $\mu$ l) containing the

treated DNA, homogenized by inversion, and, finally, the column was centrifuged at 14,500 g per 60 s. The supernatant was discarded, and 100  $\mu$ l M-wash buffer was loaded in the column and centrifuged again at 14,500 g per 60 s. The supernatant was again discarded, and 200  $\mu$ l M-desulphonation buffer was loaded into the column. This step was followed by incubation at room temperature for 20 min and centrifugation at 14,500 g per 60 s. Immediately, the supernatant was discarded once again, and the column was washed two times with 200  $\mu$ l M-wash buffer. Finally, the deaminated DNA was eluted with 13  $\mu$ l of M-elution buffer according to the manufacturer's protocol (Zymo Research, USA).

### 2.6. PCR Bisulfite Sequencing

The amplification of the bisulfite-treated DNA was carried out using the specific primers described previously [16]. Amplification reactions contained 6  $\mu$ l of bisulfite-treated DNA, the different Taq DNA polymerase: Taq Polymerase (Jena Bioscience, Germany), Hifi Polymerase (Jena Bioscience, Germany), Phusion Hot Star (Thermo Fisher Scientific, USA), and Phusion U (Thermo Fisher Scientific, USA). The thermal profile used for the PCR reaction included heat activation from 95 to 98 °C depending on the enzyme used per 4 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 20 s, at different annealing temperatures, as reported previously, [16] for 30 s, and an extension at 68 or 72 °C for 1 min depending on the enzyme used, then one cycle at 68 or 72 °C for 5 min according to the manufacturer's specification. The amplified fragments were separated by electrophoresis in agarose (Ultrapure, Invitrogen, USA) gel at 1.5%, purified by the Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, USA) following the manufacturer's instructions. Amplicon sequences were carried out in a sequencer ABI PRISM 3100 with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA).

### 2.7. Identification of Methylated Cytosines

The number and position of each cytosine in the mtDNA D-loop region were first determined to assess the theoretical methylation profile. This was followed by the alignment of sequences of samples with and without bisulfite treatment using the Bioedit software (Ibis Therapeutics, USA). Treatment of DNA with bisulfite converts cytosine residues into uracil. As a result, cytosines that survive bisulfite treatment are identified as methylated [16, 17, 31]. Accordingly, DNA methylation status was interpreted by comparing the sequencing results and the original DNA sequence. All unmethylated cytosines (C) were converted into thymine (T) and the presence of a C-peak indicated the presence of 5-methylcytosine (5mC). This section provides details of the methodology used along with information on any previous efforts with corresponding references. Any details for further modifications and research should be included.



### 2.3. Data Analyzing

All the data were expressed as the mean  $\pm$  S.D. Statistical analyses were performed, specifically by the one-way ANOVA with Tukey–Kramer Multiple Pairwise Comparisons Test. Calculations were performed using Microsoft Excel (USA), and Graph Pad InStat3 (<http://www.graphpad.com>, San Diego, CA).

## 1. RESULTS

### 1.1. Haplogroup Identification of the D-loop mtDNA Region in each Sample by Sequencing

To determine the mtDNA haplogroup, the D-loop region sequences were compared with the Cambridge reference sequence (CRS). The Amerindian haplogroups (Hg) A, B, C and D were identified with frequencies of 60%, 25%, 10%, and 5%, respectively. Furthermore, the subhaplogroups identified according to the classification scheme described by Kumar *et al.*, [29] and confirmed by Mitomaster [30] were: A2; A2b1; A2r1; A2u; B2a4; B2u; B4b; C1c and D1 (Table 1). The frequencies of each haplogroup and subhaplogroup are displayed in Table 1. Once the haplogroups were identified, a conversion control sample for each Amerindian haplogroup was carried out using the samples 7 (HgA), 15 (HgB), 18 (HgC) and 20 (HgD). Results showed the conversion of all non-methylated C into U, which are recognized as T (Table 2).

### 1.2. Identification of Specific mtDNA Methylation Sites in the D-loop Region

To identify the methylation profile in the mtDNA D-loop region, a methodology-based on PCR bisulfite sequencing coupled with reverse transcription (RT) was developed. The optimized method described by Bellizi *et al.*, [16] was tested in our first experiments. However, because the results were not always efficient and the sequences showed some background noise, then, different Taq polymerases were tested to optimize DNA amplification, and therefore, obtained better sequences of our samples. The enzymes tested to amplify the target sequence were: Taq Polymerase

(Jena Bioscience, Germany), Hifi Polymerase (Jena Bioscience, Germany) and Phusion Hot Star (Thermo Fisher Scientific, USA). The best results were obtained with the Hifi Polymerase from Jena Bioscience (Germany). Sequences were obtained directly after amplification. However, the sequences were not always reliable. Then we also tested the Phusion U polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA), which was designed with Uracil-tolerance —engineered to incorporate dUTP and amplify uracil containing templates, however, the results were very poor, since efficiency and reproducibility were very low in our hands.

Then, we tried reverse transcription of DNA containing uracil to synthesize the complementary DNA chain, which is more stable, since uracil will be changed for thymine, ensuring proper base pairing. Thymine's methyl group also provides a point of interaction for amino acids in proteins, possibly resulting in better recognition by polymerases. Furthermore, because uracil is a nitrogenous base that is mainly found in RNA, results showed that reverse transcription before DNA amplification was very efficient and reproducible in the identification of the methylated bases in the mtDNA D-loop region compared with the methodology described previously [16].

To implement this new approach based on RT-PCR, we used the SuperScript III reverse transcription enzyme package (Invitrogen, USA). Following the manufacturer's recommendation, we carried out a temperature gradient between 42-50°C, to identify the optimum synthesis temperature. It was determined that the optimum temperature to obtain the cDNA was 48°C. This RT-PCR method consisted of the amplification of the loop region divided into three subregions (T1, T2, and T3), with specific primers (Table 2) by RT-PCR and subsequent purification of each amplicon. This method has technical advances in reading longer DNA sequences of approximately 362 to 442 bp (Table 2) compared with the 151-290 bp fragment sequences that were reported previously [16]. Briefly, the procedure was as follows: after DNA

**Table 1. Mitochondrial haplogroup and subhaplogroup frequencies identified in all samples.**

Hg	N	F	Sub-Hg	N	f
A	12	0.6	A2	8	0.4
			A2b1	1	0.05
			A2r1	1	0.05
			A2u	2	0.1
B	5	0.25	B2a4	1	0.05
			B2u	1	0.05
			B4b	3	0.15
C	2	0.1	C1c	2	0.1
D	1	0.05	D1	1	0.05

Hg, mitochondrial haplogroup; Sub-Hg, mitochondrial subhaplogroup; N, number of samples; f, frequency.



**Table 2. Primer sequences, localization and annealing temperature used in the RT-PCR amplification for each fragment in the D-loop region of mtDNA.**

Primer Name	Primer sequence (5'-3')*	Primer position (nt)	Annealing temperature °C	Amplicon size (bp)
T1-F1	AGGAAGAGAGGATTTTAATTTAAATTATT	16000-16019	46.5	432
T1-R2	AGGAAGAGAGATTTTCACAAAAATAATA	16417-16435		
T2-F3	AGGAAGAGAGTATTATTTTTGTGAAATTAA	16401-16422	47	363
T2-R4	AGGAAGAGAGAACATAAATACAATAATAA	173-193		
T3-F5	AGGAAGAGAGTTATTTATTGTATTATGTGT	154-174	46.5	442
T3-R6	AGGAAGAGAGACCCATCTAAACATTTTCAA	628-648		

treatment with protocol B of the kit EZ DNA Methylation Gold (Zymo Research, USA), 6.5 µl of purified DNA or the conversion control (20 ng/µl) was added in three 200 µl tubes, followed by the addition of 0.5 µl of each specific forward primer (20 pmoles/µl), as shown in Table 2, and the necessary water to reach a final volume of 15 µl. Then the tubes were incubated per 5 min at 95°C for DNA denaturation, and then, immediately, they were incubated for 2 min at 0°C. Afterward, 4 µl of 5x first-strand buffer and 200 units (1 µl) of SuperScript III reverse transcription enzyme (Invitrogen, USA), were used which gave a final volume of 20 µl. These mixtures were incubated at 48°C per 50 min, with a final heating step of 5 min at 70°C for reverse transcription. Immediately, 6 µl of the RT mixture was added into each tube, and 3 µl buffer 10X, 0.5 µl of each primer (20 pmoles/µl) T1-F1 and T1-R2, T2-F3 and T2-R4, and T3-F5 and T3-R6 (Table 2), 0.5 µl of dNTP mix (Jena Bioscience, Germany; equimolar mixture of 10 mM dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 0.5 units high-fidelity polymerase DNA (Jena Bioscience, Germany), and water were added to reach a final volume of 30 µl. The thermal profile of PCR used included 3 min heat enzyme activation at 95°C, followed by 10 cycles of denaturation at 95°C per 40 s, with an annealing temperature of 44°C per 40 s and extension at 68°C per 60 s, followed by 35 cycles of amplification with the following thermal profile: denaturation at 95°C per 20 s, the annealing temperature according to each primer per 20 s (Table 2) and extension at 68°C per 60 s, with one final cycle at 68°C per 5 min. The amplified fragments were separated by electrophoresis in agarose (Ultrapure, Invitrogen, USA) gel at 1.5%, purified by the Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, USA) following the manufacturer's instructions. Amplicon sequences were carried out in a sequencer ABI PRISM 3100 with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). All of the sequences obtained from each sample were assembled by Bioedit software (Ibis Therapeutics, USA) and compared with the same sample sequence obtained without bisulfite treatment (Fig. 1). All unmethylated cytosines (C) were converted into thymine (T) as observed in controls (Fig. 1, panel A), since there were no methylated cytosines after RT-PCR. Contrary to this, the presence of a C-peak indicates the presence of 5-methylcytosine (5mC) in

the DNA treated with bisulfite before RT-PCR, since the methylated cytosines were conserved after this treatment (Fig. 1, panel C). The mtDNA sequences with no bisulfite treatment are displayed in Fig. 1, panels B. This procedure was carried out for the 20 DNA samples included in this study DNA sequences with no treatment are shown in Fig. 1, panels B. This procedure was repeated at least 3 times for each sample to guarantee reproducibility.

An alignment of all of the sequences with the CRS was performed to establish the differences in the number of cytosines along the D-loop region of each of the 20 sequences. Table 3 shows that the CRS has 335 cytosines, and the samples have 336 to 343 cytosines. Furthermore, our results also showed that the number of CpG varied from 27 to 28 (frequency of 0.078-0.08); CpT from 69 to 71 (0.20-0.213); CpA from 114 to 117 (0.329-0.348) and CpC from 122 to 131 (0.366-0.381). To determine the frequency of each methylated CpN (CpG, CpT, CpA, or CpC) dinucleotide site, all the sequences were compared. The results showed that methylation for CpG was between 0 to 4 (0-0.148); for CpT from 7 to 15 (0.1-0.225); for CpA from 13 to 20 (0.122-0.174); and for CpC from 18 to 29 (0.15-0.23) in the samples, while the conversion controls showed no-methylation in all CpN dinucleotide, demonstrating a full bisulfite conversion in primers that were designed previously by Bellizzi et al. [16]. The 10- bp tag was added to the 5' - ends of primers to increase the annealing temperature of the A-T enriched primer sequences [16]. F, forward primer; R, reverse primer; nt = nucleotide; bp = base pair.

The absence of methylation, when bisulfite treatment is performed after the PCR assay. The interval of methylated cytosines (5mC) and the average of all methylated cytosines fluctuated from 45 to 62 (0.13-0.182) in all samples, while the conversion controls displayed zero methylated cytosines. In addition, the methylation comparison in each of the sequencing sites among the different subhaplo groups was very similar (Table 3).

### 1.1. D-loop Region: Methylation Distribution

The methylation distribution frequency was analyzed in the 20 samples to determine whether there was any difference among CpA, CpC, CpT or CpG

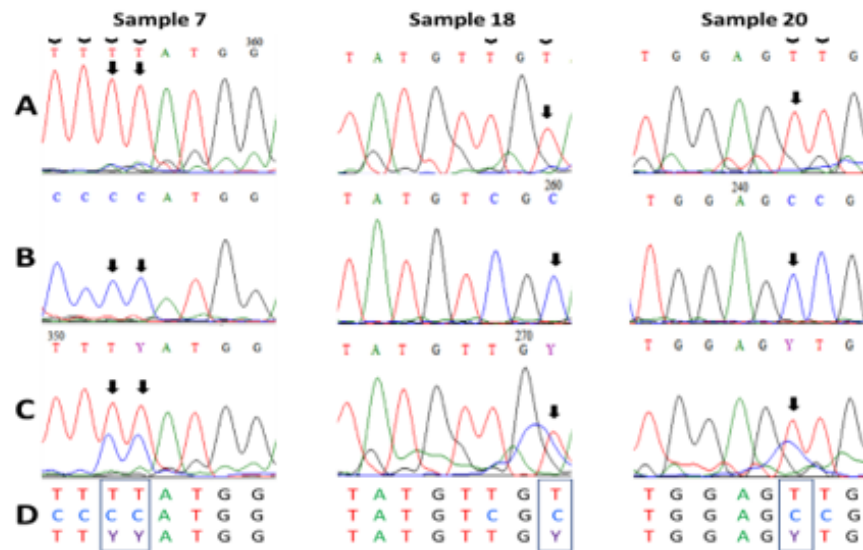


Fig. (1). Sequence electropherograms of samples 5, 18 and 20, with and without bisulfite treatment and their negative controls. Controls for DNA bisulfite conversion included the sequence of amplicons treated with bisulfite (A); sequence of the DNA without treatment (B); or sequences of DNA with bisulfite treatment (C); the DNA sequences of each panel are displayed (D). The arrow shows the base site methylated in each panel; and in D these sites are enclosed in a square. Chevron arrows show the base sites of all non-methylated cytosines converted into thymine in the DNA bisulfite conversion controls. A= Adenine; C = Cytosine; G = Guanine; T = Thymine; Y = Cytosine + Thymine.

Table 3. Frequency distribution of methylated cytosines calculated for each CpN dinucleotide residue compared with each Cp in the D-loop of mtDNA in each subhaplogroup.

Sample	Sub-Hg	Total of each CpN dinucleotide residues/Total CpN dinucleotides in each sample										Methylated CpN of each dinucleotide residues/the corresponding total of each CpN dinucleotide cytosines in each sample										
		CpG <sub>r</sub>		CpT <sub>r</sub>		CpA <sub>r</sub>		CpC <sub>r</sub>		CpN <sub>r</sub>		mCpG		mCpT		mCpA		mCpC		mCpN		
		N	f	N	f	N	f	N	f	N	f	N	f	N	f	N	f	N	f	N	f	
CRS	H2a2	27	0.08	71	0.211	114	0.34	123	0.367	335	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7+	A2	27	0.08	69	0.204	114	0.338	127	0.376	337	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	A2	27	0.08	70	0.207	114	0.338	126	0.373	337	0	0	8	0.114	17	0.149	20	0.159	45	0.134		
2	A2	27	0.08	69	0.205	114	0.339	126	0.375	336	1	0.03	7	0.101	17	0.179	29	0.23	54	0.161		
3	A2	27	0.08	70	0.207	114	0.338	126	0.373	337	2	0.07	7	0.1	15	0.132	27	0.214	51	0.151		
4	A2	27	0.08	71	0.21	115	0.341	124	0.368	337	2	0.07	12	0.169	14	0.122	25	0.212	53	0.157		
5	A2	27	0.08	71	0.21	115	0.341	124	0.368	337	1	0.03	10	0.141	15	0.13	24	0.194	50	0.148		
6	A2	27	0.07	72	0.213	114	0.337	125	0.369	338	2	0.07	11	0.153	17	0.149	23	0.184	53	0.157		
7	A2	27	0.08	69	0.204	114	0.338	127	0.376	337	3	0.11	9	0.13	14	0.123	19	0.15	45	0.134		
8	A2	27	0.07	70	0.207	114	0.337	127	0.375	338	3	0.11	12	0.171	11	0.096	18	0.142	44	0.13		
9	A2b1	27	0.07	71	0.207	115	0.335	130	0.379	343	2	0.07	9	0.121	20	0.174	27	0.208	58	0.192		
10	A2r1	28	0.08	71	0.208	114	0.335	127	0.373	340	1	0.03	10	0.141	18	0.158	24	0.189	53	0.156		
11	A2u	27	0.07	70	0.207	114	0.337	127	0.375	338	2	0.07	12	0.171	13	0.114	19	0.15	46	0.136		
12	A2u	27	0.08	70	0.208	114	0.339	125	0.372	336	3	0.11	13	0.186	16	0.14	25	0.2	57	0.17		
15+	B4b	27	0.07	71	0.208	114	0.334	129	0.378	341	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

(Table 3) Contd....

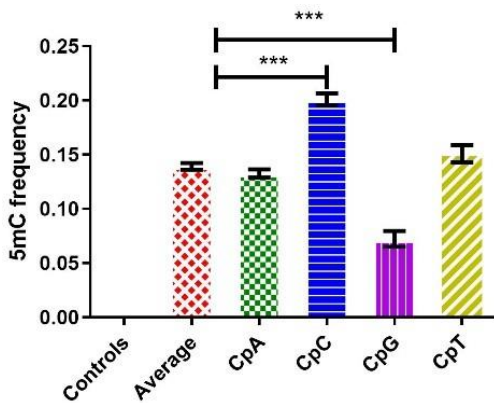




Sample	Sub-Hg	Total of each CpN dinucleotide residues/Total CpN dinucleotides in each sample										Methylated CpN of each dinucleotide residues/the corresponding total of each CpN dinucleotide cytosines in each sample									
		CpG <sub>T</sub>		CpT <sub>T</sub>		CpA <sub>T</sub>		CpC <sub>T</sub>		CpN <sub>T</sub>	mCpG		mCpT		mCpA		mCpC		mCpN		
		N	f	N	f	N	f	N	f	N	N	f	N	f	N	f	N	f	N	f	
13	B2a4a1	27	0.07	72	0.209	113	0.329	131	0.281	343	1	0.03	15	0.208	14	0.124	25	0.191	55	0.16	
14	B2u	27	0.07	71	0.208	113	0.331	130	0.381	341	3	0.11	14	0.197	16	0.142	26	0.2	59	0.173	
15	B4b	27	0.07	71	0.208	114	0.334	129	0.378	341	1	0.03	14	0.197	15	0.132	22	0.171	52	0.152	
16	B4b	27	0.07	71	0.207	114	0.332	131	0.381	343	3	0.11	12	0.169	15	0.132	21	0.16	51	0.149	
17	B4b	27	0.07	71	0.208	114	0.335	128	0.376	340	4	0.14	16	0.225	17	0.149	25	0.195	62	0.182	
18+	C1	27	0.07	71	0.209	116	0.342	125	0.368	339	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
18	C1c	27	0.07	71	0.209	116	0.342	125	0.368	339	3	0.11	11	0.155	17	0.147	29	0.234	60	0.177	
19	C1c	27	0.08	70	0.208	117	0.348	122	0.363	336	3	0.11	10	0.143	14	0.12	27	0.221	54	0.161	
20+	D1	27	0.07	71	0.208	116	0.341	126	0.37	340	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
20	D1	27	0.07	71	0.208	116	0.341	126	0.37	340	2	0.07	8	0.113	20	0.172	25	0.198	55	0.162	

+ Showed the conversion control sample 7, 15, 18, and 20 containing haplogroups **A**, **B**, **C**, and **D** respectively; **CRS**, Cambridge reference sequence; **Sub-Hg**, Sub-Haplogroup; **CpG<sub>T</sub>**, total of dinucleotide cytosine phosphorus Guanine; **CpT<sub>T</sub>**, total of dinucleotide cytosine phosphorus thymine; **CpA<sub>T</sub>**, total dinucleotide cytosine phosphorus adenine; **CpC<sub>T</sub>**, total dinucleotide cytosine phosphorus cytosine; **CpN<sub>T</sub>**, CpG<sub>T</sub> + CpT<sub>T</sub> + CpA<sub>T</sub> + CpC<sub>T</sub>; **mCpG**, methylated cytosine phosphorus guanine; **mCpT**, methylated cytosine phosphorus thymine; **mCpA**, methylated cytosine phosphorus adenine; **mCpC**, methylated cytosine phosphorus cytosine; **mCpN**, mCpG<sub>T</sub> + mCpT<sub>T</sub> + mCpA<sub>T</sub> + mCpC<sub>T</sub>; N, number of samples; f, frequency

dinucleotides in each region and between regions in the D-loop region of the mitochondrial genome by using ANOVA statistical test analysis with  $p=0.001$ . Fig. 2 displays the average methylation frequency of the 20 samples of ~0.14, and the average methylation frequencies for CpA, CpC, CpG, and CpT of 0.13, 0.20, 0.07, and 0.15, in the samples, respectively. Furthermore, the frequency value for CpC and CpG of the samples compared with the average frequency of the samples displayed statistical significance ( $p=0.001$ ).



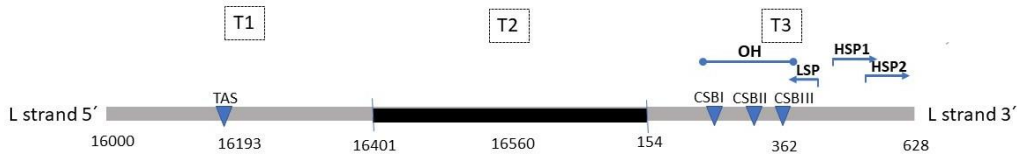
**Fig. (2). Methylation frequency in the D-loop region.** The Y-axis contains the methylation frequency for each CpN; the X-axis indicates the CpA, CpC, CpG and CpT dinucleotides. Standard deviation and \*\*\* statistically significant ( $p=0.001$ ). (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

The methylation distribution frequency was analyzed for the 20 samples to determine whether there is any difference between the regions after dividing the D-loop region of mtDNA into 3 consecutive fragments called T1, T2, and T3, as described above (Fig. 3). These differences were determined by ANOVA statistical analysis with values considered statistically significant at  $p=0.05$ . The results showed statistically significant values in T2 and T3 regions compared with the 0.14 average methylation frequency (Fig. 4). The average methylation frequencies in T1, T2 and T3 were 0.149, 0.007, and 0.294, respectively. Interestingly, the T1 region from nucleotide 16151 to nucleotide 16350 and the T3 region from nucleotide 282 to nucleotide 500 contained the highest density of methylated cytosines, which are sites where some of the regulatory elements of mtDNA are located (Fig. 5).

The methylation frequency per region of CpA, CpC, CpG, and CpT was calculated to determine whether there is any significant difference among the CpA, CpC, CpG, and CpT regions by using ANOVA significance test. Figure 6 shows the average methylation level for CpA=0.119, CpC= 0.173, CpG=0.108 and CpT =0.114 in T1; CpA=0.017, CpG =0.009 and CpT=0.005, and CpC=0 in T2; and CpA=0.205, CpC=0.343, CpG=0.175 and CpT=0.367 in T3.

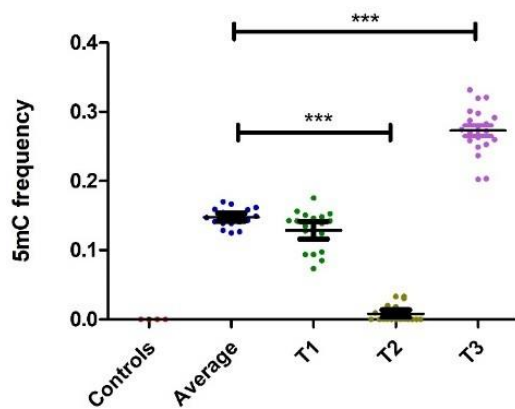
## 1. DISCUSSION

DNA methylation is a well-known epigenetic mechanism that regulates gene expression [32, 33]. The epigenetic term refers to heritable alterations that are not due to changes in DNA sequence but rather due to its modification. Furthermore, epigenetic



**Fig. (3). Schematic representation of mtDNA D-loop region.** The three regions examined on the L strand (T1, T2 and T3) are represented as marked. Regulatory elements are also displayed as follows: OH, origin of replication of the H strand; CSBI, CSBII and CSBIII, conserved sequence blocks I, II and III, respectively; TAS, termination associated sequence; LSP, light strand promoter; and HSP1 and HSP2, heavy strand promoters 1 and 2. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

modifications though DNA methylation alter the DNA accessibility and the chromatin structure, thereby regulating the patterns of gene expression [34]. Consequently, DNA methylation may regulate functions such as differentiation [32], embryo development [35], gene expression [36], cancer development [11], somatic reprogramming [37], among others. It is also well known that methylation occurs in the carbon 5 position of cytosine to produce 5-methyl-cytosine (5mC), which is maintained in nuclear gene promoters and gene bodies through the DNA methyltransferases activity [38, 39]. Methylation in the CpG sites has been observed in the nuclear genome. Methylation also has been identified in CpA, CpC, CpT or CpG (CpN, where N is any nucleotide) sites in the mitochondrial genome.



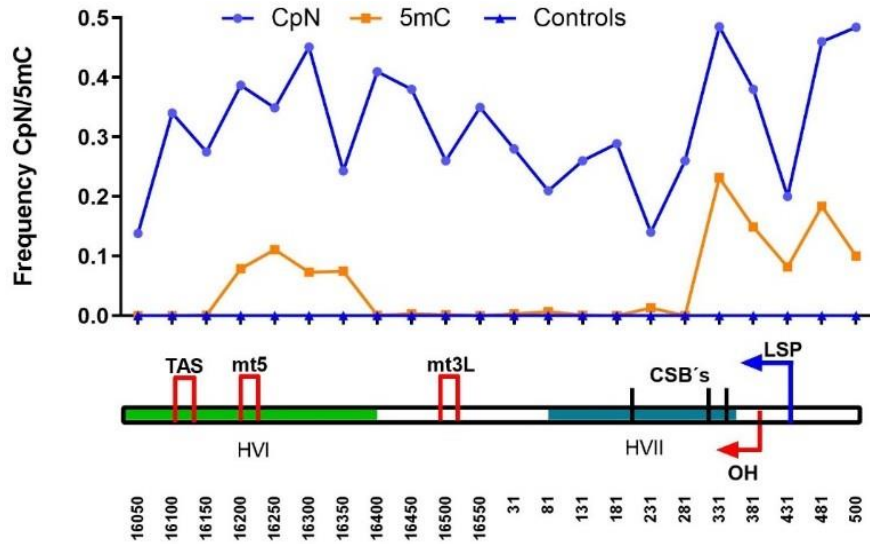
**Fig. (4). Frequency and distribution of methylation in the D-loop region of mtDNA.** The Y-axis indicates the methylation frequency; the X-axis zones display the average mtDNA methylation per region. \*\*\* shows the standard deviation; statistically significant  $p=0.001$ . (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

However, the methylation site and proportion in the mitochondrial genome have been controversial for a long time [31, 40]. Compared to nuclear DNA methylation, mtDNA methylation is a relatively new research field in which gene regulation, such as expression and silencing, has been explored [41, 42].

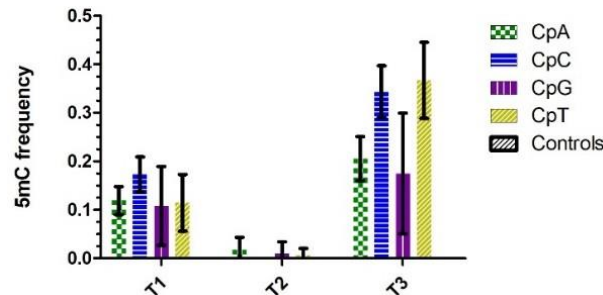
This phenomenon explains the inverse correlation between methylation density within the regulatory sequences of a gene (cis) or other genes (trans) and their transcriptional levels [43, 44]. MtDNA methylation was observed for the first time in mice in 1984 and was shown to occur at a very low level <5% [45]. The first evidence of methylation in human mtDNA was reported in 2011 in Down syndrome [46] and was detected by mass spectrometry where hypomethylation was observed.

Identification of methylated cytosines in the CpN sites has been used successfully for the methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP) procedure [23], which showed higher costs compared the mass spectrometry method. In addition, mtDNA methylation levels were overestimated [21, 46-48]. Both the methods exclusively measure the relative and not the absolute level of DNA or mtDNA methylation, nor the position of the methylated cytosine. Another approach to identify the methylated cytosines based on PCR- bisulfite sequencing allows for the identification of the position of methylated cytosines and is relatively lower in cost than MeDIP or mass spectrophotometry [16]. The new focus of this study provides more information other than cloning and sequencing, since, cloning and sequencing give the information about methylation of a few sequences that are selected when the clones are obtained that may be between 10 and 15 [16, 17, 31]. The RT-PCR and sequencing will reflect global DNA methylation changes very well, letting the discovery of unknown epigenetic changes. Pyrosequencing is better when the candidate genes are unknown, although this method is more expensive. In addition, this method involves the bisulfite conversion of DNA, followed by the PCR amplification, and then, the methylation status of the amplified fragments is then quantified by pyrosequencing. Furthermore, pyrosequencing requires specialized equipment, such as PyroMark from Qiagen or the Qseq instrument from Bio Molecular Systems [49, 50]. Whereby pyrosequencing is used, there is no need to clone; both the methods are more expensive, but also informative.

Simply amplifying bisulfite modified DNA was very difficult and the efficiency was low; consequently, and since uracil is a nitrogenous base that is mainly found in RNA, then, reverse transcription before DNA amplification was tested; the results described in this



**Fig. (5). Schematic representation of frequency distribution of mtDNA methylation in the D-loop region.** HVI (hypervariable regions I) and HVII (hypervariable regions II) are represented in green and blue, respectively; the regulatory elements are displayed as follows: OH, origin of replication of the H strand; CSBI, CSBII and CSBIII, conserved sequence blocks I, II and III respectively; TAS, termination associated sequence; LSP, light strand promoter; mt5, control element, and mt3L, L-strand control element. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).



**Fig. (6). Frequency and distribution of methylation in CpA, CpC, CpG and CpT at D-loop region of mtDNA.** The average values of methylation frequency at the three zones from the 20 samples used in this study are shown. (A higher resolution / colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

study confirm that this is a very efficient and reproducible procedure for the identification of the methylated bases in the mtDNA D-loop region compared with the methodology described previously [16].

Therefore, in this study, the first step to determine mtDNA methylation was the sodium bisulfite treatment of the total DNA, followed by the reverse transcription of this bisulfite-treated DNA because non-methylated cytosines change from cytosine to uracil [51]. In addition, we included a conversion control by using the standard PCR amplification techniques, which erases methylation patterns so after bisulfite treatment, we cannot differentiate between methylated or un-methylated cytosine bases [17]. Results demonstrated

bisulfite conversion efficiency since we observed conversion of all cytosines.

The methylated site display (MSD) described in this study is a unique, affordable technique for the analysis of the CpN methylation profile at the D-loop region of mtDNA. The PCR-bisulfite sequencing method described by Bellizzi *et al.* in 2013 [16] was modified, starting from the change of the size of the PCR product amplification. Then, this region was divided into three fragments (T1, T2 and T3), and PCR was coupled to a reverse transcription reaction (RT-PCR bisulfite), as described above. For each sample, three D-loop fragments were amplified using the specific primers (Table 2), which included 10 enrichment cycles followed by 30 amplification cycles with different



extension temperatures to have a better amplification. Optimization of the amplification of larger fragments to obtain the methylation profile of mtDNA D-loop region maintained the specificity, and time analysis costs were reduced.

This new approach for RT-PCR bisulfite sequencing was reproduced in 20 samples and four conversion controls, demonstrating the feasibility and reproducibility of the identification of methylated cytosines in CpN dinucleotides. Our results showed that the number of cytosines varies from 336 to 343 in the D-loop region of mtDNA genome, which correspond to frequencies ranging from 0.27 to 0.29 in the samples and zero in the controls. The number of the cytosines methylated in this region ranges from 44 to 62, which corresponds to frequencies ranging from 0.13 to 0.18. We knew that our conversion controls did not have methylated cytosines, since they were PCR products, so all the cytosines present in the sequence had to be transformed to uracil by the bisulfite treatment. All conversion controls showed cytosine conversion, confirming that the treatment with bisulfite is highly efficient, and demonstrating that there are no false positives caused by a low conversion efficiency. It was also observed that the conversion was not affected by the haplogroup, since the methylation frequency in all controls tested was zero.

On the other hand, each haplogroup has a different number of cytosines, then it can be expected that the number of methylated cytosines is different and depends on the haplogroup or subhaplogroup in each sample as well as on the physiological stage of each individual. In addition, the haplogroup and subhaplo- group were determined for all samples, as well as the methylation frequency in each CpN dinucleotide per sequence. The low frequency of CpG methylation observed previously by Matuzuda *et al.*, in 2018 [31] and Mechta *et al.*, in 2017 [40] is in agreement with our results since the CpG dinucleotides showed the lower methylation frequency in our study. In addition, the low levels of CpG methylated residues in cell cultures were similar to the results observed by Bellizzi *et al.*, in 2013 [16]. Differences in methylation DNA levels were also may be due to variations in normal tissues due to aging, environmental factors diseases, the tissue of study, among others [17, 23, 24, 45].

The samples contained four different Amerindian haplogroups (A, B, C and D) and nine subhaplogroups (A2; A2b1; A2r1; A2u; B2a4; B2u; B4b; C1c and D1), which are in accordance with the previous publications on Mexican populations [52]. The frequency of methylated cytosines varied in the range of 0.13-0.183 (representing the number of methylated cytosines, 44 to 62, respectively) in the whole D-loop region of mtDNA. The sample with a higher frequency of methylation was in the range similar to the previous publications [16, 17]; however, in our study, the lowest value was 0.13, which means an average of 0.14 for the frequency of methylated cytosines. These results are important because the observed differences may be because our study was conducted for a population

of individuals with Amerindian ancestry, whereas the previous studies were conducted for populations of individuals with European ancestry [24, 27].

While comparing the average of the methylation frequency between samples of this study and those obtained by Bellizzi *et al.* [16], it was observed that the calculated methylated cytosine frequency was 0.156 in this study, which was lower than the frequency of 0.35 observed previously [16]. Despite these differences, our results support this new approach to identify the methylated sites in the mtDNA, since they show non-random, reproducible patterns of mtDNA methylation predominantly in a non-CpG context and at single nucleotide resolution. Differences in global methylation between the samples of this study compared with the previous report of Bellizzi *et al.*, [16] may be derived from the haplogroup, physiological stage of the individual, or the different environmental condition of the population, which may vary greatly [53]. For example, our samples included Amerindian haplogroups, the environmental conditions entail a highly contaminated city (Mexico City), and the physiological factors and metabolism may be different compared with the samples of Bellizzi *et al.*, [16] since the studied samples were from 14 men and 16 women of different ages (41–102 years old), and European origin. Furthermore, our results are in agreement with previous studies in different populations, which have shown that relative levels of mtDNA methylation abundance can vary depending on the severity of a disease or the environment in which the individual lives [23-27].

The 0.07 average frequency of CpG methylated cytosines compared with 0.14 of the general average methylated frequency displayed a significant difference, with  $p = 0.001$ . In addition, this value was the lowest compared with the frequency calculated for non-CpG dinucleotides (0.16), which is similar to the results reported previously by Cardon *et al.*, [54] and Bellizzi *et al.*, [16] for human mtDNA. The range of CpG methylated residues among the samples in this study fluctuated from zero to 4 CpGs. Whereas the frequency at non-CpG methylated residues ranged from 7-15 for CpT; 13-20 for CpA and 18-29 for CpC, with averages of 0.15, 0.13 and 0.20, respectively, compared with the average of all methylated cytosines. These differences have been suggested to be caused by the lower affinity per CpG and higher affinity for CpA, CpC and CpT dinucleotides, because DNMT3a lacks exon 3 [18]. In addition, DNMT3a is also localized in the mitochondria methylate non-CpG dinucleotide sites at nDNA during embryo development [55]. In addition, the potential tissue-specific mtDNA methylation by this enzyme has been suggested. Consequently, it proposes that the interaction between DNMT1iso3, DNMT3a and the mitochondrial environment could be dependent on the cell specialization, which could thus favor the differences in the methylation frequency observed in this study. In addition to those that have been identified inside the mitochondria, it is known that DNMT3a can methylate non-CpG sites in the nDNA in embryonic phases (47).



Although the roles of DNMTs in DNA methylation have been highly praised, human DNA methylation preference for non-CpG residues rather than for CpG is not clearly known. DNMT1 has nearly exclusive affinity for CpG sites *in vitro* [18, 19] but it is required for non-CpG methylation in an *in vivo* setting [56]. Meanwhile, DNMT3a has affinity for the non-CpG sites [19]. The presence and combination of the DNMTs may explain the methylation site specificity, as well as the activity levels in the different cell types [57]. This finding makes it more difficult to understand the mechanisms of the regulation of gene expression by DNA methylation, due to transcription factors, miRNAs, long noncoding RNAs (lncRNAs) and DNA-binding proteins that play important roles in determining the site-specificity of DNMTs [58]. The interplay of these factors might contribute to site-specificity and cell-type specific methylation patterns in mtDNA, since cell function is different in each tissue.

To date, there is no known specific pattern of methylation in mtDNA associated with any specific disease, population or environment. Nevertheless, it has been reported that changes in human mtDNA methylation have been associated with environmental exposure to pollutants, different diseases or proliferative phases [17, 24, 44]. Since the D-loop region is a hot spot for mtDNA alterations, the objective of this study was to assess the distribution of methylated cytosine frequencies within the D-loop region of the human mtDNA. Interestingly, the highest density of methylated cytosines was distributed into two main regions at nucleotide sites from 282 to 500 and from 16151 to 16350, containing essential transcription and replication elements. These results agree with the previous suggestions, which have associated methylation with a role in the regulation of transcription [17, 26]. Figures 2 and 4 describe these two regions in more detail. These regions contain the following regulatory elements: the terminator-associated sequence [59] and the control element (mt5) within the nucleotide positions 16081-16138 and 16194-16208, respectively, which are near or in the region (16151- 16350), with higher methylation frequencies with an average of 0.084; moreover, the H strand origin (OH), the conserved sequence blocks I, II and III (CSBI, CSBII and CSBIII), and the light strand promoter (LSP) are within the nucleotide positions 110-441, 213-224, 299-314, 346-361, 392-445, respectively, and contain an average frequency of 0.10 of the methylated cytosines within the nucleotide positions from 182-500 (Figure 4). Regions 16000-16150 and 16351-181 contain the lowest methylation regions and only one regulatory element. This observation supports the idea that the binding of mitochondria proteins, such as transcription factor A (TFAM), single-stranded DNA binding protein (mtSSB), replicative helicase Twinkle, DNA polymerases B and  $\gamma$  (PolgB and Pol  $\gamma$ ), to nonmethylated regions regulates transcription and replication of mtDNA [60]. Similarly, the regulation in the nuclear genome by cytosine methylation, due to the binding of proteins such as DNMTs, histone methyltransferase (HMT), histone acetyltransferase

(HAT) or histone deacetylase (HDAC), changes methylation patterns [61].

The results of this study are supported by those reported by Bianchessi *et al.* [17], who observed methylated cytosines from nucleotide 171 to 323, which increased 7S mtDNA synthesis. Then, mtDNA methylation could influence the replication and expression of the mitochondrial genome, which had been previously hypothesized by Bellizzi *et al.* [16, 17]. It should be noted that the position of 7S mtDNA is the nucleotide site 16106-191, which overlaps with the region containing the lowest frequency of methylation, from 16401 to 231, probably due to the importance of 7S mtDNA in many functions within the mitochondria [60], which shows that the results of this study are comparable with that study using a different approach. Although, it can be an underestimation of methylation levels if the primers contain any thymine that corresponds to non-CpG cytosines, the probability is low, since only 2 of the primers contain 6 of these thymines. In addition, Bellizzi *et al.*, [16] obtained the same sequence in all the sequenced clones. Furthermore, the tag added to the primers AGGAAGAGAG help to hold the primer and prevent it from undergoing frequent transient opening events (fraying) of ends, thereby, increasing priming efficiency.

The previously reported relationship between the changes in mtDNA methylation profile and mitochondrial gene expression [23, 24, 47] can be improved by the sequencing of the mitochondrial genome to determine the position of the methylated cytosines and to understand the role of methylation changes in the diseases, population signatures or environmental changes. Consequently, the application of the method described in this study will help in the understanding and clarification of the role of methylation cytosine in the regulation processes of mtDNA expression according to the physiological stage of human individuals.

## CONCLUSION

In spite of the recent intensification of research on mtDNA methylation, its significance and mechanisms are still far from being completely unraveled; our new approach to describe the methylation patterns of RT-PCR-bisulfite sequencing replaces the PCR-bisulfite sequencing method to amplify and sequence mtDNA D-loop region. This new approach will simplify studies to identify associations of mtDNA methylation with different metabolic stages of the cell and with diseases because the developed procedure will save time and resources to determine whether there is a causal relationship between the variants, positions or methylation patterns of mtDNA and any disease, population or organism modifications in the environment. Bisulfite sequencing targeted by RT-PCR will facilitate an increase in the size of the database of mtDNA sequences that display the CpN methylation sites in a manner that is quicker and less expensive.



## ETHICAL APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

The study was approved by the ethics committee of the National Committee for Scientific Research, Mexico.

## HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No animals were used in this study. All reported experiments on humans were followed in accordance with the ethical standards of the committee responsible for human experimentation (institutional national), and with the *Helsinki Declaration* of 1975, as revised in 2008 (<http://www.wma.net/en/20activities/10ethics/10helsinki/>).

## AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The data supporting the findings of the article is available in the [Mention repository name] at [Mention URL],

## CONSENT FOR PUBLICATION

Written consent has been obtained from the individuals.

## FUNDING

We thank the FIS IMSS for the support FIS/IMSS/PROT/PRIO/17/063; the support granted from CONACYT CB258103 and the scholarship CVU 290402 granted from CONACYT and IMSS 011-2013 for the development of the student and the postgrad program of the Department of Genetics and Molecular Biology, Research and Advanced Studies Center of National Polytechnic Institute.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors disclose no conflicts.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

## AUTHORS' CONTRIBUTIONS

M.L.M. and A.A.P.M., conceived and designed the analysis; A.A.P.M., N.G.H collected the samples; A.A.P.M., collected the data and developed the experiments; H.S reproduced all experiments; M.L.M. and A.A.P.M., and N.G.H., performed the analysis of data; M.L.M., A.A.P.M., and N.G.H. wrote the paper.

## REFERENCES

- [1] Grivell LA. Mitochondrial DNA. Small, beautiful and essential. *Nature* 1989; 341(6243): 569-71.
- [2] <http://dx.doi.org/10.1038/341569a0> PMID: 2797187  
Grzybowska-Szatkowska L, Slaska B. Mitochondrial NADH dehydrogenase polymorphisms are associated with breast cancer in Poland. *J Appl Genet* 2014; 55(2): 173-81. <http://dx.doi.org/10.1007/s13353-013-0190-9> PMID: 24414975
- [3] Rebelo AP, Dillon LM, Moraes CT. Mitochondrial DNA transcription regulation and nucleoid organization. *J Inher Metab Dis* 2011; 34(4): 941-51. <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-011-9330-8> PMID: 21541724
- [4] Gilkerson R, Bravo L, Garcia I, *et al.* The mitochondrial nucleoid: integrating mitochondrial DNA into cellular homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5(5): a011080. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a011080> PMID: 23637282
- [5] Raule N, Sevini F, Li S, *et al.* The co-occurrence of mtDNA mutations on different oxidative phosphorylation subunits, not detected by haplogroup analysis, affects human longevity and is population specific. *Aging Cell* 2014; 13(3): 401-7. <http://dx.doi.org/10.1111/acer.12186> PMID: 24341918
- [6] Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet* 2012; 13(12): 878-90. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3275> PMID: 23154810
- [7] Hudson G, Gomez-Duran A, Wilson IJ, Chinnery PF. Recent mitochondrial DNA mutations increase the risk of developing common late-onset human diseases. *PLoS Genet* 2014; 10(5): e1004369. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004369> PMID: 24852434
- [8] Dowling DK. Evolutionary perspectives on the links between mitochondrial genotype and disease phenotype. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1840(4): 1393-403. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.013> PMID: 24246955
- [9] Mposhi A, Van der Wijst MG, Faber KN, Rots MG. Regulation of mitochondrial gene expression, the epigenetic enigma. *Front Biosci* 2017; 22: 1099-113. <http://dx.doi.org/10.2741/4535> PMID: 28199194
- [10] D'Aquila P, Bellizzi D, Passarino G. Mitochondria in health, aging and diseases: the epigenetic perspective. *Biogerontology* 2015; 16(5): 569-85. <http://dx.doi.org/10.1007/s10522-015-9562-3> PMID: 25711915
- [11] Behzad MM, Shahrabi S, Jaseb K, Bertacchini J, Ketabchi N, Saki N. Aberrant DNA Methylation in Chronic Myeloid Leukemia: Cell Fate Control, Prognosis, and Therapeutic Response. *Biochem Genet* 2018; 56(3): 149-75. <http://dx.doi.org/10.1007/s10528-018-9841-1> PMID: 29388070
- [12] Liu Y, Tan Q, Liu F. Differentially methylated circulating DNA: A novel biomarker to monitor beta cell death. *J Diabetes Complications* 2018; 32(3): 349-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2017.08.012> PMID: 29415820
- [13] Xin Y, O'Donnell AH, Ge Y, *et al.* Role of CpG context and content in evolutionary signatures of brain DNA methylation. *Epigenetics* 2011; 6(11): 1308-18. <http://dx.doi.org/10.4161/epi.6.11.17876> PMID: 22048252
- [14] Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(5): 1412-7. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0510310103> PMID: 16432200
- [15] Iacobazzi V, Castegna A, Infantino V, Andria G. Mitochondrial DNA methylation as a next-generation biomarker and diagnostic tool. *Mol Genet Metab* 2013; 110(1-2): 25-34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.07.012> PMID: 23920043
- [16] Bellizzi D, D'Aquila P, Scafone T, *et al.* The control region of mitochondrial DNA shows an unusual CpG and non-CpG methylation pattern. *DNA Res* 2013; 20(6): 537-47. <http://dx.doi.org/10.1093/dnares/dst029> PMID: 23804556



- [1] Bianchessi V, Vinci MC, Nigro P, *et al.* Methylation profiling by bisulfite sequencing analysis of the mtDNA Non-Coding Region in replicative and senescent Endothelial Cells. *Mitochondrion* 2016; 27: 40-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2016.02.004> PMID: 26910457
- [2] Saini SK, Mangalharu KC, Prakasam G, Bamezai RNK. DNA Methyltransferase1 (DNMT1) Isoform3 methylates mitochondrial genome and modulates its biology. *Sci Rep* 2017; 7(1): 1525. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-01743-y> PMID: 28484249
- [3] Gowher H, Jeltsch A. Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpG [correction of non-CpA] sites. *J Mol Biol* 2001; 309(5): 1201-8. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2001.4710> PMID: 11399089
- [4] Yu D, Du Z, Pian L, *et al.* Mitochondrial DNA Hypomethylation Is a Biomarker Associated with Induced Senescence in Human Fetal Heart Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int* 2017; 2017:1764549 <http://dx.doi.org/10.1155/2017/1764549> PMID: 28484495
- [5] Jia Y, Song H, Gao G, Cai D, Yang X, Zhao R. Maternal Betaine Supplementation during Gestation Enhances Expression of mtDNA-Encoded Genes through D-Loop DNA Hypomethylation in the Skeletal Muscle of Newborn Piglets. *J Agric Food Chem* 2015; 63(46): 10152-60. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04418> PMID: 26527363
- [6] Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 2012; 13(7): 484- 92. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3230> PMID: 22641018
- [7] Byun HM, Panni T, Motta V, *et al.* Effects of airborne pollutants on mitochondrial DNA methylation. *Part Fibre Toxicol* 2013; 10: 18. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-8977-10-18> PMID: 23656717
- [8] Pirola CJ, Gianotti TF, Burgueño AL, *et al.* Epigenetic modification of liver mitochondrial DNA is associated with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Gut* 2013; 62(9): 1356-63. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302962> PMID: 22879518
- [9] Blanch M, Mosquera JL, Ansoleaga B, Ferrer I, Barrachina M. Altered Mitochondrial DNA Methylation Pattern in Alzheimer Disease-Related Pathology and in Parkinson Disease. *Am J Pathol* 2016; 186(2): 385-97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.10.004> PMID: 26776077
- [10] Devall M, Mill J, Lunnon K. The mitochondrial epigenome: a role in Alzheimer's disease? *Epigenomics* 2014; 6(6): 665-75. <http://dx.doi.org/10.2217/epi.14.50> PMID: 25531259
- [11] Mishra M, Kowluru RA. Epigenetic Modification of Mitochondrial DNA in the Development of Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56(9): 5133-42. <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.15-16937> PMID: 26241401
- [12] Taylor RW, Taylor GA, Durham SE, Turnbull DM. The determination of complete human mitochondrial DNA sequences in single cells: implications for the study of somatic mitochondrial DNA point mutations. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(15): E74-4. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/29.15.e74> PMID: 11470889
- [13] 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. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-11-293> PMID: 21978175
- [14] Lott MT, Leipzig JN, Derbeneva O, *et al.* Wallace, mtDNA Variation and Analysis Using Mitomap and Mitomaster *Curr Protoc Bioinformatics* 2013; 44: 1 23-1-26.
- [15] Matsuda S, Yasukawa T, Sakaguchi Y, *et al.* Accurate estimation of 5-methylcytosine in mammalian mitochondrial DNA. *Sci Rep* 2018; 8(1): 5801. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-24251-z> PMID: 29643477
- [16] Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology* 2013; 38(1): 23-38. <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2012.112> PMID: 22781841
- [17] Lioznova AV, Khamis AM, Artemov AV, *et al.* CpG traffic lights are markers of regulatory regions in human genome. *BMC Genomics* 2019; 20(1): 102. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-018-5387-1> PMID: 30709331
- [18] Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer* 2011; 2(6): 607-17. <http://dx.doi.org/10.1177/1947601910393957> PMID: 21941617
- [19] Hanna CW, Demond H, Kelsey G. Epigenetic regulation in development: is the mouse a good model for the human? *Hum Reprod Update* 2018; 24(5): 556-76. <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmy021> PMID: 29992283
- [20] Rose NR, Klose RJ. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1839(12): 1362-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.02.007> PMID: 24560929
- [21] Ficz G. New insights into mechanisms that regulate DNA methylation patterning. *J Exp Biol* 2015; 218(Pt 1): 14-20. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.107961> PMID: 25568447
- [22] Raine A, Liljedahl U, Nordlund J. Data quality of whole genome bisulfite sequencing on Illumina platforms. *PLoS One* 2018; 13(4):e0195972 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0195972> PMID: 29668744
- [23] Urich MA, Nery JR, Lister R, Schmitz RJ, Ecker JR. MethylC-seq library preparation for base-resolution whole-genome bisulfite sequencing. *Nat Protoc* 2015; 10(3): 475-83. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2014.114> PMID: 25692984
- [24] Mehta M, Ingerslev LR, Fabre O, Picard M, Barrès R. Evidence Suggesting Absence of Mitochondrial DNA Methylation. *Front Genet* 2017; 8: 166. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2017.00166> PMID: 29163634
- [25] Abel ED. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation in Cardiac and Skeletal Muscle. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2018; 129: 266-78. PMID: 30166722
- [26] Lundsgaard AM, Fritzen AM, Kiens B. Molecular Regulation of Fatty Acid Oxidation in Skeletal Muscle during Aerobic Exercise. *Trends Endocrinol Metab* 2018; 29(1): 18-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2017.10.011> PMID: 29221849
- [27] Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 2008; 9(6): 465- 76. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2341> PMID: 18463664
- [28] Feng J, Zhou Y, Campbell SL, *et al.* Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci* 2010; 13(4): 423-30. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2514> PMID: 20228804
- [29] Pollack Y, Kasir J, Shemer R, Metzger S, Szyf M. Methylation pattern of mouse mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 1984; 12(12): 4811-24. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/12.12.4811> PMID: 6330684
- [30] Infantino V, Castegna A, Iacobazzi F, *et al.* Impairment of methyl cycle affects mitochondrial methyl availability and glutathione level in Down's syndrome. *Mol Genet Metab* 2011; 102(3): 378-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.11.166> PMID: 21195648
- [31] Shock LS, Thakkar PV, Peterson EJ, Moran RG, Taylor SM. DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(9): 3630-5. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1012311108> PMID: 21321201
- [32] Ghosh S, Sengupta S, Scaria V. Hydroxymethyl cytosine marks in the human mitochondrial genome are dynamic in nature. *Mitochondrion* 2016; 27: 25-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2016.01.003> PMID: 26826294
- [33] Kurdyukov S, Bullock M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology (Basel)* 2016; 5(1):E3



- [1] Morris J, Grimmer-Somers K, Kumar S, *et al.* Effectiveness of a physiotherapy-initiated telephone triage of orthopedic waitlist patients. *Patient Relat Outcome Meas* 2011; 2: 151-9. PMID: 22915976
- [2] Huang Y, Pastor WA, Shen Y, Tahiliani M, Liu DR, Rao A. The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing *PLoS One* 2010; 5(1): e8888.
- [3] Martinez-Cortes J, Salazar-Flores J, Haro-Guerrero R, *et al.* Maternal admixture and population structure in Mexican-Mestizos based on mtDNA haplogroups. *Am J Phys Anthropol* 2013; 151(4): 526-37. PMID: 23754474
- [4] Patil V, Cuenin C, Chung F, *et al.* Human mitochondrial DNA is extensively methylated in a non-CpG context. *Nucleic Acids Res* 2019; 47(19): 10072-85. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkz762> PMID: 31665742
- [5] Cardon LR, Burge C, Clayton DA, Karlin S. Pervasive CpG suppression in animal mitochondrial genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(9): 3799-803. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.91.9.3799> PMID: 8170990
- [6] Guo JU, Su Y, Shin JH, *et al.* Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nat Neurosci* 2014; 17(2): 215-22. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3607> PMID: 24362762
- [7] Grandjean V, Yaman R, Cuzin F, Rassoulzadegan M. Inheritance of an epigenetic mark: the CpG DNA methyltransferase 1 is required for de novo establishment of a complex pattern of non-CpG methylation. *PLoS One* 2007; 2(11): e1136 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0001136> PMID: 17989773
- [8] Wong M, Gertz B, Chestnut BA, Martin LJ. Mitochondrial DNMT3A and DNA methylation in skeletal muscle and CNS of transgenic mouse models of ALS. *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 279. <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2013.00279> PMID: 24399935
- [9] Denis H, Ndlovu MN, Fuks F. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO Rep* 2011; 12(7): 647-56. <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2011.110> PMID: 21660058
- [10] Harte AL, Varma MC, Tripathi G, *et al.* High fat intake leads to acute postprandial exposure to circulating endotoxin in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2012; 35(2): 375-82. <http://dx.doi.org/10.2337/dc11-1593> PMID: 22210577
- [11] Nicholls TJ, Minczuk M. In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA. *Exp Gerontol* 2014; 56: 175-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2014.03.027> PMID: 24709344
- [12] Kim JA, Kwon M, Kim J. Allosteric Regulation of Chromatin-Modifying Enzymes. *Biochemistry* 2018. PMID: 30335997





## XI Referencias.

- [1] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144(5) (2011) 646-74.
- [2] T.N. Seyfried, L.C. Huysentruyt, On the origin of cancer metastasis, *Crit Rev Oncog* 18(1-2) (2013) 43-73.
- [3] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA Cancer J Clin* 68(6) (2018) 394-424.
- [4] J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram, C. Mathers, D.M. Parkin, M. Pineros, A. Znaor, F. Bray, Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods, *Int J Cancer* 144(8) (2019) 1941-1953.
- [5] S.A. Rodriguez-Cuevas, J.P. Luna-Arias, [Impact of genomic signatures in the therapeutic decision of breast cancer], *Cirugia y cirujanos* 75(6) (2007) 415-7.
- [6] G.A. Colditz, K.A. Kaphingst, S.E. Hankinson, B. Rosner, Family history and risk of breast cancer: nurses' health study, *Breast Cancer Res Treat* 133(3) (2012) 1097-104.
- [7] K. Polyak, Breast cancer: origins and evolution, *J Clin Invest* 117(11) (2007) 3155-63.
- [8] K.H. Allison, Molecular pathology of breast cancer: what a pathologist needs to know, *Am J Clin Pathol* 138(6) (2012) 770-80.
- [9] Y.S. Sun, Z. Zhao, Z.N. Yang, F. Xu, H.J. Lu, Z.Y. Zhu, W. Shi, J. Jiang, P.P. Yao, H.P. Zhu, Risk Factors and Preventions of Breast Cancer, *Int J Biol Sci* 13(11) (2017) 1387-1397.
- [10] G. Premenopausal Breast Cancer Collaborative, M.J. Schoemaker, H.B. Nichols, L.B. Wright, M.N. Brook, M.E. Jones, K.M. O'Brien, H.O. Adami, L. Baglietto, L. Bernstein, K.A. Bertrand, M.C. Boutron-Ruault, T. Braaten, Y. Chen, A.E. Connor, M. Dorransoro, L. Dossus, A.H. Eliassen, G.G. Giles, S.E. Hankinson, R. Kaaks, T.J. Key, V.A. Kirsh, C.M. Kitahara, W.P. Koh, S.C. Larsson, M.S. Linet, H. Ma, G. Masala, M.A. Merritt, R.L. Milne, K. Overvad, K. Ozasa, J.R. Palmer, P.H. Peeters, E. Riboli, T.E. Rohan, A. Sadakane, M. Sund, R.M. Tamimi, A. Trichopoulou, G. Ursin, L. Vatten, K. Visvanathan, E. Weiderpass, W.C. Willett, A. Wolk, J.M. Yuan, A. Zeleniuch-Jacquotte, D.P. Sandler, A.J. Swerdlow, Association of Body Mass Index and Age With Subsequent Breast Cancer Risk in Premenopausal Women, *JAMA Oncol* 4(11) (2018) e181771.
- [11] Y. Feng, M. Spezia, S. Huang, C. Yuan, Z. Zeng, L. Zhang, X. Ji, W. Liu, B. Huang, W. Luo, B. Liu, Y. Lei, S. Du, A. Vuppapapati, H.H. Luu, R.C. Haydon, T.C. He, G. Ren, Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis, *Genes Dis* 5(2) (2018) 77-106.
- [12] M. Brandon, P. Baldi, D.C. Wallace, Mitochondrial mutations in cancer, *Oncogene* 25(34) (2006) 4647-62.



- [13] L.S. Palacio-Mejia, E. Lazcano-Ponce, B. Allen-Leigh, M. Hernandez-Avila, [Regional differences in breast and cervical cancer mortality in Mexico between 1979-2006], *Salud publica de Mexico* 51 Suppl 2 (2009) s208-19.
- [14] M.E. Barnard, C.E. Boeke, R.M. Tamimi, Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes, *Biochim Biophys Acta* 1856(1) (2015) 73-85.
- [15] H.A. Azim, Jr., A.H. Partridge, Biology of breast cancer in young women, *Breast Cancer Res* 16(4) (2014) 427.
- [16] L.A. Brinton, D.R. Brogan, R.J. Coates, C.A. Swanson, N. Potischman, J.L. Stanford, Breast cancer risk among women under 55 years of age by joint effects of usage of oral contraceptives and hormone replacement therapy, *Menopause* 25(11) (2018) 1195-1200.
- [17] M. Patricio, J. Pereira, J. Crisostomo, P. Matafome, M. Gomes, R. Seica, F. Caramelo, Using Resistin, glucose, age and BMI to predict the presence of breast cancer, *BMC Cancer* 18(1) (2018) 29.
- [18] P. J, Epigenetics: The role of Metylation in the Mechanism of Action of Tumor Suppressor Genes, *Ann. N. Y. Acad. Sci* 2003, pp. 71-83.
- [19] E. O'Sullivan, M. Goggins, DNA methylation analysis in human cancer, *Methods in molecular biology* 980 (2013) 131-56.
- [20] L. Wang, W.R. Bamlet, M. de Andrade, L.A. Boardman, J.M. Cunningham, S.N. Thibodeau, G.M. Petersen, Mitochondrial genetic polymorphisms and pancreatic cancer risk, *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 16(7) (2007) 1455-9.
- [21] J.A. Canter, A.R. Kallianpur, F.F. Parl, R.C. Millikan, Mitochondrial DNA G10398A polymorphism and invasive breast cancer in African-American women, *Cancer Res* 65(17) (2005) 8028-33.
- [22] S.A. Wajed, P.W. Laird, T.R. DeMeester, DNA methylation: an alternative pathway to cancer, *Annals of surgery* 234(1) (2001) 10-20.
- [23] S.H. Kwak, K.S. Park, K.U. Lee, H.K. Lee, Mitochondrial metabolism and diabetes, *Journal of diabetes investigation* 1(5) (2010) 161-9.
- [24] A. Solano, A. Playan, M.J. Lopez-Perez, J. Montoya, [Genetic diseases of the mitochondrial DNA in humans], *Salud publica de Mexico* 43(2) (2001) 151-61.
- [25] T.J. Nicholls, M. Minczuk, In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA, *Exp Gerontol* 56 (2014) 175-81.
- [26] A. Torroni, K. Huoponen, P. Francalacci, M. Petrozzi, L. Morelli, R. Scozzari, D. Obinu, M.L. Savontaus, D.C. Wallace, Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations, *Genetics* 144(4) (1996) 1835-50.
- [27] J.A. Petros, A.K. Baumann, E. Ruiz-Pesini, M.B. Amin, C.Q. Sun, J. Hall, S. Lim, M.M. Issa, W.D. Flanders, S.H. Hosseini, F.F. Marshall, D.C. Wallace, mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(3) (2005) 719-24.
- [28] E. Kirches, Mitochondrial and nuclear genes of mitochondrial components in cancer, *Curr Genomics* 10(4) (2009) 281-93.



- [29] S. Jimenez-Morales, C.J. Perez-Amado, E. Langley, A. Hidalgo-Miranda, Overview of mitochondrial germline variants and mutations in human disease: Focus on breast cancer (Review), *Int J Oncol* 53(3) (2018) 923-936.
- [30] A.M. Czarnecka, T. Krawczyk, K. Plak, A. Klemba, M. Zdrozny, R.S. Arnold, B. Kofler, P. Golik, A. Szybinska, J. Lubinski, M. Mossakowska, E. Bartnik, J.A. Petros, Mitochondrial genotype and breast cancer predisposition, *Oncol Rep* 24(6) (2010) 1521-34.
- [31] L.M. Booker, G.M. Habermacher, B.C. Jessie, Q.C. Sun, A.K. Baumann, M. Amin, S.D. Lim, C. Fernandez-Golarz, R.H. Lyles, M.D. Brown, F.F. Marshall, J.A. Petros, North American white mitochondrial haplogroups in prostate and renal cancer, *J Urol* 175(2) (2006) 468-72; discussion 472-3.
- [32] M. Verma, R.K. Naviaux, M. Tanaka, D. Kumar, C. Franceschi, K.K. Singh, Meeting report: mitochondrial DNA and cancer epidemiology, *Cancer Res* 67(2) (2007) 437-9.
- [33] S.P. Hu, J.P. Du, D.R. Li, Y.G. Yao, Mitochondrial DNA haplogroup confers genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma in Chaoshanese from Guangdong, China, *PLoS One* 9(1) (2014) e87795.
- [34] R.K. Bai, S.M. Leal, D. Covarrubias, A. Liu, L.J. Wong, Mitochondrial genetic background modifies breast cancer risk, *Cancer Res* 67(10) (2007) 4687-94.
- [35] W. Zhu, W. Qin, P. Bradley, A. Wessel, C.L. Puckett, E.R. Sauter, Mitochondrial DNA mutations in breast cancer tissue and in matched nipple aspirate fluid, *Carcinogenesis* 26(1) (2005) 145-52.
- [36] C. Xu, D. Tran-Thanh, C. Ma, K. May, J. Jung, J. Vecchiarelli, S.J. Done, Mitochondrial D310 mutations in the early development of breast cancer, *Br J Cancer* 106(9) (2012) 1506-11.
- [37] H. Fang, L. Shen, T. Chen, J. He, Z. Ding, J. Wei, J. Qu, G. Chen, J. Lu, Y. Bai, Cancer type-specific modulation of mitochondrial haplogroups in breast, colorectal and thyroid cancer, *BMC Cancer* 10 (2010) 421.
- [38] Y. Wang, V.W. Liu, P.C. Tsang, P.M. Chiu, A.N. Cheung, U.S. Khoo, P. Nagley, H.Y. Ngan, Microsatellite instability in mitochondrial genome of common female cancers, *Int J Gynecol Cancer* 16 Suppl 1 (2006) 259-66.
- [39] L. Li, L. Chen, J. Li, W. Zhang, Y. Liao, J. Chen, Z. Sun, Correlational study on mitochondrial DNA mutations as potential risk factors in breast cancer, *Oncotarget* 7(21) (2016) 31270-83.
- [40] D. Covarrubias, R.K. Bai, L.C. Wong, S.M. Leal, Mitochondrial DNA variant interactions modify breast cancer risk, *J Hum Genet* 53(10) (2008) 924-928.
- [41] K. Darvishi, S. Sharma, A.K. Bhat, E. Rai, R.N. Bamezai, Mitochondrial DNA G10398A polymorphism imparts maternal Haplogroup N a risk for breast and esophageal cancer, *Cancer Lett* 249(2) (2007) 249-55.
- [42] P. Parrella, Y. Xiao, M. Fliss, M. Sanchez-Cespedes, P. Mazzarelli, M. Rinaldi, T. Nicol, E. Gabrielson, C. Cuomo, D. Cohen, S. Pandit, M. Spencer, C. Rabitti, V.M. Fazio, D. Sidransky, Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates, *Cancer Res* 61(20) (2001) 7623-6.



- [43] S. Tommasi, P. Favia, S. Weigl, A. Bianco, B. Pilato, L. Russo, A. Paradiso, V. Petruzzella, Mitochondrial DNA variants and risk of familial breast cancer: an exploratory study, *Int J Oncol* 44(5) (2014) 1691-8.
- [44] D.J. Tan, R.K. Bai, L.J. Wong, Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer, *Cancer Res* 62(4) (2002) 972-6.
- [45] A. Mosquera-Miguel, V. Alvarez-Iglesias, A. Carracedo, A. Salas, A. Vega, A. Carracedo, R. Milne, A.C. de Leon, J. Benitez, A. Carracedo, A. Salas, Is mitochondrial DNA variation associated with sporadic breast cancer risk?, *Cancer Res* 68(2) (2008) 623-5; author reply 624.
- [46] (!!! INVALID CITATION !!! [4, 29, 39]).
- [47] S. Blein, C. Bardel, V. Danjean, L. McGuffog, S. Healey, D. Barrowdale, A. Lee, J. Dennis, K.B. Kuchenbaecker, P. Soucy, M.B. Terry, W.K. Chung, D.E. Goldgar, S.S. Buys, R. Breast Cancer Family, R. Janavicius, L. Tihomirova, N. Tung, C.M. Dorfling, E.J. van Rensburg, S.L. Neuhausen, Y.C. Ding, A.M. Gerdes, B. Ejlersen, F.C. Nielsen, T.V. Hansen, A. Osorio, J. Benitez, R.A. Conejero, E. Segota, J.N. Weitzel, M. Thelander, P. Peterlongo, P. Radice, V. Pensotti, R. Dolcetti, B. Bonanni, B. Peissel, D. Zaffaroni, G. Scuvera, S. Manoukian, L. Varesco, G.L. Capone, L. Papi, L. Ottini, D. Yannoukakos, I. Konstantopoulou, J. Garber, U. Hamann, A. Donaldson, A. Brady, C. Brewer, C. Foo, D.G. Evans, D. Frost, D. Eccles, Embrace, F. Douglas, J. Cook, J. Adlard, J. Barwell, L. Walker, L. Izatt, L.E. Side, M.J. Kennedy, M. Tischkowitz, M.T. Rogers, M.E. Porteous, P.J. Morrison, R. Platte, R. Eeles, R. Davidson, S. Hodgson, T. Cole, A.K. Godwin, C. Isaacs, K. Claes, K. De Leeneer, A. Meindl, A. Gehrig, B. Wappenschmidt, C. Sutter, C. Engel, D. Niederacher, D. Steinemann, H. Plendl, K. Kast, K. Rhiem, N. Ditsch, N. Arnold, R. Varon-Mateeva, R.K. Schmutzler, S. Preisler-Adams, N.B. Markov, S. Wang-Gohrke, A. de Pauw, C. Lefol, C. Lasset, D. Leroux, E. Rouleau, F. Damiola, G.S. Collaborators, H. Dreyfus, L. Barjhoux, L. Golmard, N. Uhrhammer, V. Bonadona, V. Sornin, Y.J. Bignon, J. Carter, L. Van Le, M. Piedmonte, P.A. DiSilvestro, M. de la Hoya, T. Caldes, H. Nevanlinna, K. Aittomaki, A. Jager, A.M. van den Ouweland, C.M. Kets, C.M. Aalfs, F.E. van Leeuwen, F.B. Hogervorst, H.E. Meijers-Heijboer, Hebon, J.C. Oosterwijk, K.E. van Roozendaal, M.A. Rookus, P. Devilee, R.B. van der Luijt, E. Olah, O. Diez, A. Teule, C. Lazaro, I. Blanco, J. Del Valle, A. Jakubowska, G. Sukiennicki, J. Gronwald, J. Lubinski, K. Durda, K. Jaworska-Bieniek, B.A. Agnarsson, C. Maugard, A. Amadori, M. Montagna, M.R. Teixeira, A.B. Spurdle, W. Foulkes, C. Olswold, N.M. Lindor, V.S. Pankratz, C.I. Szabo, A. Lincoln, L. Jacobs, M. Corines, M. Robson, J. Vijai, A. Berger, A. Fink-Retter, C.F. Singer, C. Rappaport, D.G. Kaulich, G. Pfeiler, M.K. Tea, M.H. Greene, P.L. Mai, G. Rennert, E.N. Imyanitov, A.M. Mulligan, G. Glendon, I.L. Andrulis, S. Tchatchou, A.E. Toland, I.S. Pedersen, M. Thomassen, T.A. Kruse, U.B. Jensen, M.A. Caligo, E. Friedman, J. Zidan, Y. Laitman, A. Lindblom, B. Melin, B. Arver, N. Loman, R. Rosenquist, O.I. Olopade, R.L. Nussbaum, S.J. Ramus, K.L. Nathanson, S.M. Domchek, T.R. Rebbeck, B.K. Arun, G. Mitchell, B.Y. Karlan, J. Lester, S. Orsulic, D. Stoppa-Lyonnet, G. Thomas, J. Simard, F.J. Couch, K. Offit, D.F. Easton, G. Chenevix-Trench, A.C. Antoniou, S. Mazoyer, C.M. Phelan, O.M. Sinilnikova, D.G. Cox, An original



phylogenetic approach identified mitochondrial haplogroup T1a1 as inversely associated with breast cancer risk in BRCA2 mutation carriers, *Breast Cancer Res* 17 (2015) 61.

[48] C.H. Arrowsmith, C. Bountra, P.V. Fish, K. Lee, M. Schapira, Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery, *Nat Rev Drug Discov* 11(5) (2012) 384-400.

[49] F.L.C. Faldoni, C.A. Rainho, S.R. Rogatto, Epigenetics in Inflammatory Breast Cancer: Biological Features and Therapeutic Perspectives, *Cells* 9(5) (2020).

[50] E.J. Radford, An Introduction to Epigenetic Mechanisms, *Prog Mol Biol Transl Sci* 158 (2018) 29-48.

[51] V. Iacobazzi, A. Castegna, V. Infantino, G. Andria, Mitochondrial DNA methylation as a next-generation biomarker and diagnostic tool, *Mol Genet Metab* 110(1-2) (2013) 25-34.

[52] P. D'Aquila, D. Bellizzi, G. Passarino, Mitochondria in health, aging and diseases: the epigenetic perspective, *Biogerontology* 16(5) (2015) 569-85.

[53] M.M. Behzad, S. Shahrabi, K. Jaseb, J. Bertacchini, N. Ketabchi, N. Saki, Aberrant DNA Methylation in Chronic Myeloid Leukemia: Cell Fate Control, Prognosis, and Therapeutic Response, *Biochem Genet* 56(3) (2018) 149-175.

[54] Y. Liu, Q. Tan, F. Liu, Differentially methylated circulating DNA: A novel biomarker to monitor beta cell death, *J Diabetes Complications* 32(3) (2018) 349-353.

[55] S. Saxonov, P. Berg, D.L. Brutlag, A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(5) (2006) 1412-7.

[56] V. Bianchessi, M.C. Vinci, P. Nigro, V. Rizzi, F. Farina, M.C. Capogrossi, G. Pompilio, V. Gualdi, A. Lauri, Methylation profiling by bisulfite sequencing analysis of the mtDNA Non-Coding Region in replicative and senescent Endothelial Cells, *Mitochondrion* 27 (2016) 40-7.

[57] D. Bellizzi, P. D'Aquila, T. Scafone, M. Giordano, V. Riso, A. Riccio, G. Passarino, The control region of mitochondrial DNA shows an unusual CpG and non-CpG methylation pattern, *DNA Res* 20(6) (2013) 537-47.

[58] S.K. Saini, K.C. Mangalhar, G. Prakasam, R.N.K. Bamezai, DNA Methyltransferase1 (DNMT1) Isoform3 methylates mitochondrial genome and modulates its biology, *Sci Rep* 7(1) (2017) 1525.

[59] H. Gowher, A. Jeltsch, Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpG [correction of non-CpA] sites, *J Mol Biol* 309(5) (2001) 1201-8.

[60] D. Yu, Z. Du, L. Pian, T. Li, X. Wen, W. Li, S.J. Kim, J. Xiao, P. Cohen, J. Cui, A.R. Hoffman, J.F. Hu, Mitochondrial DNA Hypomethylation Is a Biomarker Associated with Induced Senescence in Human Fetal Heart Mesenchymal Stem Cells, *Stem Cells Int* 2017 (2017) 1764549.

[61] Y. Jia, H. Song, G. Gao, D. Cai, X. Yang, R. Zhao, Maternal Betaine Supplementation during Gestation Enhances Expression of mtDNA-Encoded



- Genes through D-Loop DNA Hypomethylation in the Skeletal Muscle of Newborn Piglets, *J Agric Food Chem* 63(46) (2015) 10152-60.
- [62] P.A. Jones, Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond, *Nat Rev Genet* 13(7) (2012) 484-92.
- [63] M. Blanch, J.L. Mosquera, B. Ansoleaga, I. Ferrer, M. Barrachina, Altered Mitochondrial DNA Methylation Pattern in Alzheimer Disease-Related Pathology and in Parkinson Disease, *Am J Pathol* 186(2) (2016) 385-97.
- [64] H.M. Byun, T. Panni, V. Motta, L. Hou, F. Nordio, P. Apostoli, P.A. Bertazzi, A.A. Baccarelli, Effects of airborne pollutants on mitochondrial DNA methylation, *Part Fibre Toxicol* 10 (2013) 18.
- [65] M. Devall, J. Mill, K. Lunnon, The mitochondrial epigenome: a role in Alzheimer's disease?, *Epigenomics* 6(6) (2014) 665-75.
- [66] C.J. Pirola, T.F. Gianotti, A.L. Burgueno, M. Rey-Funes, C.F. Loidl, P. Mallardi, J.S. Martino, G.O. Castano, S. Sookoian, Epigenetic modification of liver mitochondrial DNA is associated with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease, *Gut* 62(9) (2013) 1356-63.
- [67] M. Mishra, R.A. Kowluru, Epigenetic Modification of Mitochondrial DNA in the Development of Diabetic Retinopathy, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56(9) (2015) 5133-42.
- [68] R.W. Taylor, G.A. Taylor, S.E. Durham, D.M. Turnbull, The determination of complete human mitochondrial DNA sequences in single cells: implications for the study of somatic mitochondrial DNA point mutations, *Nucleic Acids Res* 29(15) (2001) E74-4.
- [69] S. Kumar, C. Bellis, M. Zlojutro, P.E. Melton, J. Blangero, J.E. Curran, Large scale mitochondrial sequencing in Mexican Americans suggests a reappraisal of Native American origins, *BMC Evol Biol* 11 (2011) 293.
- [70] M.T. Lott, J.N. Leipzig, O. Derbeneva, H.M. Xie, D. Chalkia, M. Sarmady, V. Procaccio, D.C. Wallace, mtDNA Variation and Analysis Using Mitomap and Mitomaster, *Curr Protoc Bioinformatics* 44 (2013) 1 23 1-26.
- [71] S. Matsuda, T. Yasukawa, Y. Sakaguchi, K. Ichiyanagi, M. Unoki, K. Gotoh, K. Fukuda, H. Sasaki, T. Suzuki, D. Kang, Accurate estimation of 5-methylcytosine in mammalian mitochondrial DNA, *Scientific Reports* 8(1) (2018) 5801.
- [72] G. Martinez-Cortes, J. Salazar-Flores, J. Haro-Guerrero, R. Rubi-Castellanos, J.S. Velarde-Felix, J.F. Munoz-Valle, M. Lopez-Casamichana, E. Carrillo-Tapia, L.M. Canseco-Avila, C.M. Bravi, M. Lopez-Armenta, H. Rangel-Villalobos, Maternal admixture and population structure in Mexican-Mestizos based on mtDNA haplogroups, *Am J Phys Anthropol* 151(4) (2013) 526-37.
- [73] A.A. Perez-Munoz, M. de Lourdes Munoz, N. Garcia-Hernandez, H. Santander-Lucio, A New Approach to Identify the Methylation Sites in the Control Region of Mitochondrial DNA, *Curr Mol Med* (2020).