



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN OSTEOSARCOMA FAMILIAR A
TRAVÉS DE SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

P R E S E N T A
REBECA RAMOS MORENO

TUTOR: DRA. GABRIELA E. MERCADO CELIS
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA
ONCOGENÓMICA

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Contenido

ÍNDICE	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
8.5.2. Análisis con MutSig (Mutation Significance) 52	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
8.6 Perfil de variación en el número de copias	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1. ANTECEDENTES	5
1.1. Epidemiología.....	5
1.2. Cuadro clínico, factores pronósticos y tratamiento	5
1.3. Factores causales	6
1.3.1. Factores relacionados con el desarrollo.....	6
1.3.2. Factores ambientales asociados.....	7
1.4. Bases genéticas y moleculares del OSM.....	12
1.4.1. Nivel cromosómico	12
1.4.2. Nivel génico	15
1.5. Secuenciación de Nueva Generación (SNG)	21
1.6. Aplicaciones de la SNG para el estudio del cáncer hereditario	23
2. PRESENTACIÓN DEL CASO	26
2.1. Caso 1 (5200000000041).....	26
2.2. Caso 2 (5200000000042).....	27
2.3. Árbol genealógico.....	28
3. JUSTIFICACIÓN	29
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
5. OBJETIVOS	30
Objetivo general.....	30
Objetivos particulares	30
6. HIPÓTESIS	30
7. METODOLOGÍA	31
7.1. Tipo de estudio	31
7.2. Reclutamiento de pacientes	31
7.3. Recolección y toma de muestras	31
7.4. Extracción de DNA.....	31
7.5. Cuantificación y control de calidad	32
7.6. Control de calidad para secuenciación.....	32
7.7. Genotipificación Affymetrix SNP 6.0	32
7.8. Secuenciación de genoma y exoma.....	33
7.8.1. Construcción de librerías	34
7.8.2. Amplificación de clústers y secuenciación	34
7.9. Análisis de exoma.....	34
8. RESULTADOS	38

8.1. Cuantificación y geles de integridad	38
8.2. Análisis de genotipos (SNP 6. 0 Affymetrix)	40
8.2.1. Genotipos asignados.....	40
8.2.2. Análisis para revisión de errores mendelianos.....	41
8.2.2. Pureza y ploidía	44
8.3. Cobertura de secuenciación	46
8.4. Mutaciones germinales	47
8.5. Mutaciones somáticas.....	48
8.5.1. Análisis con MuTect.....	48
8.5.2. Análisis con MutSig (Mutation Significance)	50
8.6 Perfil de variación en el número de copias.....	55
8.7. Rearreglos cromosómicos	57
8.7 Identificación de patógenos	60
8.8 Validación para P53	61
8.9 Exposición Ambiental	62
9. DISCUSIÓN	65
10. CONCLUSIONES.....	71
11. PERSPECTIVAS A FUTURO	73
12. BIBLIOGRAFÍA.....	75

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Árbol genealógico.....	28
Figura 2. Procesamiento de muestras 1a parte.....	36
Figura 3. Procesamiento de muestras 2a parte.....	37
Figura 4. Procesamiento de datos de secuenciación	37
Figura 5. Gel de Integridad. Todas las muestras muestran integridad adecuada para su procesamiento.	40
Figura 6. (A) Análisis de asignación de genotipos	41
Figura 6. (B) Análisis de asignación de genotipos	41
Figura 7. Análisis de errores mendelianos 1	42
Figura 8. Análisis de errores mendelianos 2	44
Figura 9. Modelo de pureza y plodía. Caso 1.....	44
Figura 10. Modelo de Pureza y Plodía. Caso 2.....	45
Figura 11. Perfil de CNV de la familia	¡Error! Marcador no definido.
Figura 12. Perfil de CNV del paciente menor (041).....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 13. Perfil de CNV del paciente mayor (042).....	57
Figura 14. Rearreglos cromosómicos	60
Figura 15. Alineamiento de secuencias Exón 5.....	63
Figura 16. Alineamiento de secuencias Exón 8.....	64
Figura 17. Mapa casa habitación de la familia (estrella grande) y fábrica de fertilizantes (estrella pequeña) 57	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Alteraciones cromosómicas más frecuentes en OSM convencional.....	13
Tabla 2. Genes asociados a osteosarcoma	19
Tabla 3. Comparación de tecnologías de SNG.....	22

<i>Tabla 4. Cuantificación muestras familia.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 5. Cuantificaciones muestras osteosarcoma esporádico.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 6. Análisis Absolut.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabla 7. Análisis de cobertura de muestras de OSM</i>	<i>49</i>
<i>Tabla 8. Filtros para Identificación de mutaciones somáticas.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabla 9. Tabla de resultados de MuTec & MutSig</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 10. Lista de mutaciones no silentes.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabla 11. Análisis DRanger rearrreglos cromosómicos.....</i>	<i>58</i>
<i>Tabla 12. Patógenos identificados por PathSeq</i>	<i>60</i>

1. ANTECEDENTES

El osteosarcoma (OSM) es definido por el National Cancer Institut (NCI) como cáncer óseo de rápido crecimiento que se localiza más frecuentemente en las metáfisis adyacentes a la zona de crecimiento de huesos largos. Es un tumor maligno que se origina a partir de células osteoblásticas anormales de origen mesenquimal, productoras de matriz osteoide (1).

1.1. Epidemiología

Esta entidad presenta dos picos de edad, el primero en población joven, niños y adolescentes entre los 9-19 años, y el segundo entre los 74-84 años, con mayor frecuencia en hombres que en mujeres (2). Se reporta una tasa de incidencia en esta población de 12.0 para hombres y de 6.1 (Tasa x 10⁶) para mujeres, en población mexicana y ligeramente mayor en el mismo sector poblacional en EU, con 12.6 y 11.7(3), respectivamente. Estudios epidemiológicos han reportado que en EU y Europa, la incidencia de osteosarcoma está aumentando en la población joven (1).

1.2. Cuadro clínico, factores pronósticos y tratamiento

El cuadro clínico característico es dolor, aumento de volumen, debilidad y limitación del movimiento del miembro afectado. El tratamiento general para OSM es cirugía y quimioterapia, lo que representa alta morbilidad (escisiones quirúrgicas amplias, amputación y desarticulación del miembro). La quimioterapia es la alternativa de tratamiento; sin embargo, existe un gran número de pacientes con escasa respuesta a este tratamiento (4).

Desde el punto de vista histopatológico, el OSM se ha clasificado en convencionales y no convencionales. El OSM convencional es el más común (75% de los casos), el cual se divide a su vez en tres subgrupos: osteoblástico (50%), fibroblástico (17%) y condroblástico (33%); y no convencionales, subclasificados en telangiectásico, de bajo grado, de células pequeñas, secundario, parosteal, periosteal y de alto grado superficial (5).

La sobrevida en esta población a cinco años es del 55-75%; sin embargo, este dato puede variar dependiendo de factores, como la presencia de enfermedad metastásica al momento del diagnóstico, también se considera de importancia la localización del tumor, disminuyendo el porcentaje en localización pélvica y en cuanto al subtipo histopatológico se considera de mejor pronóstico los tumores paraosteales. Otros factores pronósticos de gran importancia son el tamaño del tumor, la extensión a tejidos blandos, porcentaje de necrosis después de la quimioterapia neoadyuvante, márgenes quirúrgicos y recurrencia de la enfermedad.

1.3. Factores causales

En cuanto a su etiología, se han asociado diversos factores causales, los cuales se resumen a continuación:

1.3.1. Factores relacionados con el desarrollo

Considerando que uno de los picos de edad en los que se presenta esta entidad es entre la primera y segunda décadas de la vida, se ha sugerido que existe relación con el remodelado óseo y los desórdenes causados por producción de altos niveles de hormonas de crecimiento, ya que se ha observado que individuos con acromegalia o de talla mayor al promedio durante la pubertad y alto peso al nacer (en relación con altos niveles de IGF durante el desarrollo fetal), incrementa el riesgo para el desarrollo de OSM.

1.3.2. Factores ambientales asociados.

1.3.2.1. Agentes físicos

El agente físico más frecuentemente asociado es la radiación ionizante, que es el cancerígeno humano más extensamente estudiado y está relacionado a la mayoría de las neoplasias. Se considera el principal agente medioambiental implicado en la etiopatogenia del OSM, condrosarcoma y fibrosarcoma. El tejido óseo adulto está considerado como relativamente resistente a la acción carcinogénica de la radiación, incrementando el riesgo, sólo después de ser sometido a dosis terapéuticas superiores a 1,000 cGy. No obstante, existe un incremento leve del riesgo de OSM después de la terapia con bajas dosis de radiación ionizante para tratar condiciones benignas y está implicada en el 3% de los OSM tanto en cánceres de pacientes adultos como pediátricos. El período medio de latencia es de 12-16 años, con límites entre 4 y 40 años.

1.3.2.2. Agentes químicos

Se han descrito hasta ahora numerosos compuestos que inducen OSM, destacan el metilcolantreno, el óxido de berilio y el silicato de berilio-zinc. En los OSM inducidos por berilio se ha sugerido que se trata de un iniciador indirecto que desencadena alteraciones genéticas preneoplásicas. Por otra parte se han asociado quimioterapéuticos antineoplásicos como factor de riesgo para la inducción de OSM como segunda neoplasia, en población pediátrica, principalmente ciclofosfámidas, ifosfámidas, melfalán, procarbacin, tiotepa, bleomicina, carmustina, lomustina, cisplatino, carboplatino, altretamina, amocitina, belustine, cariolisina, clormetina, cloraminofeno, dacarbacin, estramustina, manomustina, sarcolisina, esparamustina y tretamina (6).

Se han analizado otros elementos como el fluoruro, que fue asociado con la incidencia de OSM aunque no se estableció una relación estadísticamente significativa (7). Sin embargo, otro estudio sugiere que el hecho de beber agua

fluorada como factor asociado con el desarrollo de cáncer primario óseo en niños donde el agente causal potencial no es todavía claro (8).

También se han asociado pesticidas utilizados en horticultura, a cáncer en población infantil en edades de 0-4 años. En adolescentes se relacionó el desarrollo de OSM con el trabajo en granjas incluso por exposición parental. Por su parte Blair y cols. describieron también la asociación entre la exposición a pesticidas y el desarrollo de sarcomas y cáncer testicular (9). Se analizó la asociación entre el desarrollo de algunos sarcomas y tres tipos de pesticidas (fungicidas, insecticidas y herbicidas) y el desarrollo de sarcomas óseos, donde más del 30% correspondió a OSM y el resto a condrosarcomas (10).

1.3.3 Factores ocupacionales parentales

a) Los mecanismos potencialmente implicados en la ocupación parental y el mayor riesgo de OSM en hijos zona preconceptionales por daño genético en células germinales y subsiguiente predisposición; b) exposición intrauterina directa por trabajo materno; c) exposición postnatal indirecta a través de ropa, zapatos y utensilios que se almacenan o limpian en casa. Operkalski *et al.* (11) en 1987 describieron que los hijos de madres que habían trabajado en la industria manufacturera tenían mayor riesgo de OSM con un riesgo relativo (RR) de 3,8 (IC95%). Krinstensen *et al.* (9) en 1996 reportaron mayor riesgo de OSM en hijos de padres trabajadores de granjas agrícolas en Noruega, con RR de 2,9 (IC95% :1-4 6,2)(9). Schwartzbaum *et al.* (12) describieron en 1991 un mayor riesgo de OSM en hijos de padres ocupados en jardinería y en contacto con fertilizantes, herbicidas y pesticidas con un RR de 2.8 (IC 95%: 1.2-6.4)(12).

1.3.4 Agentes biológicos

La asociación directa entre agentes víricos y sarcomas óseos no está muy documentada. Aunque diversos virus RNA y DNA causan OSM en varias especies,

sólo el RNA, denominado FBJ del ratón, llamado así por sus descubridores (Finkel, Biskis y Jinkins) o virus inductor de OSM (13). Es un virus potentísimo, pues tras diluirlo miles de veces e inocularse a ratones recién nacidos, el 100% desarrollan OSM con metástasis óseas multifocales. Ha sido aislado en sarcomas espontáneos. Es el único virus que, además de los tumores desarrollados en la zona de inoculación, genera exclusivamente sarcomas óseos. Los OSM inducidos por el virus FBJ evidencian numerosas partículas de RNA con microscopía electrónica. Otro virus asociado es el denominado RFB, virus ecotrópico tipo C, retrovirus aislado del ratón CF-1, asociado con la inducción de osteomas. Aunque esto se ha logrado describir en modelos murinos, en humanos los intentos han resultado infructíferos y se sugiere una relación indirecta basada en: a) la administración de extractos acelulares de OSM humanos en hámsters, que produce un incremento significativo de OSM y fibrosarcomas en los animales; b) detección de anticuerpos específicos anti-OSM en paciente y familiares más cercanos; c) aislamiento de linfocitos citotóxicos, y d) el virus FBJ del ratón posee genes implicados en la oncogénesis humana (6).

1.3.5 Factores hereditarios.

Los principales síndromes de cáncer familiar que tienen un mayor riesgo de OSM junto con otros cánceres son los siguientes: Enfermedad de Paget, retinoblastoma (RB) familiar, síndrome de Li-Fraumeni, síndrome de Rothmund-Thomson, síndrome de Bloom y OSM familiar.

1.3.5.1 Enfermedad de Paget y osteítis deformante

Esta enfermedad autosómica dominante predispone principalmente a OSM y en menor proporción a fibrosarcoma, condrosarcoma y tumor de células gigantes. En casos familiares se ha documentado la pérdida de heterocigosidad en los *loci* genéticos D18S60 y D18S42, localizados en la región 11.2 del cromosoma 18q. Esta localización genética coincide con la ubicación de uno de los diversos genes supresores tumorales implicados en la etiopatogenia del OSM. SQT1, TNFRSF11A

y TNFRSF11B son los genes asociados a esta enfermedad, las mutaciones SQSTM1 son la causa más frecuente de la forma clásica, presentándose en 10 a 50% de los casos familiares y de 5 a 30% de casos sin historia familiar.

1.3.5.2 Retinoblastoma hereditario

Tumor embrionario típico de los primeros meses de edad, se presentan en dos variedades diferentes, la hereditaria o familiar y la esporádica o no hereditaria. La variedad hereditaria corresponde al 40% de los retinoblastomas (RB). La presencia de la mutación del gen *RB1*, localizado en el brazo largo del cromosoma 13q14.3, condiciona en las células germinales el mayor riesgo de segundas neoplasias en los supervivientes y de RB en sus descendientes. La mayoría de segundos tumores son sarcomas y casi el 50% son OSM sin estar asociados al tratamiento administrado. En el RB hereditario el riesgo de desarrollar una segunda neoplasia se incrementa con el paso del tiempo y puede llegar a ser del 90% a los 30 años. El gen *RB1* codifica una fosfoproteína nuclear que regula las fases S, G2 y M del ciclo celular.

1.3.5.3 Síndrome Li-Fraumeni

El síndrome de Li-Fraumeni, con un patrón mendeliano autosómico dominante, se caracteriza por una elevada frecuencia de sarcomas (óseos y de tejidos blandos) en las épocas infantil y juvenil y carcinomas adrenocorticales. En la población general el riesgo de desarrollar alguna de estas neoplasias se sitúa en el 1%, en los portadores de la mutación en el gen *P53* se sitúa en el 50% a los 30 años de edad y en el 90% a los 60-70 años. El principal gen implicado en la mayoría de pacientes es *P53*, gen supresor tumoral ubicado en el cromosoma 17p13.1. Regula la replicación de DNA y sus productos fosfoprotéicos son básicos para mantener la integridad del genoma humano, a partir de sus funciones reguladoras en el ciclo celular.

1.3.5.4 Síndrome de Rothmund-Thompson

Enfermedad autosómica recesiva caracterizada por poiquilodermia congénita asociada con otras manifestaciones extracutáneas de gravedad variable. Se asocia con un mayor riesgo para desarrollar cáncer cutáneo (carcinoma de células basales, de células escamosas y enfermedad de Bowen), adenocarcinoma gástrico, fibrosarcoma y OSM. El gen causal de la enfermedad está ubicado en la región 8q24.3 y se denomina *RECQL-4*. Este gen codifica una DNA helicasa cuya función consiste en desenrollar correctamente la doble espiral de DNA hasta obtener filamentos únicos.

1.3.5.5 Síndrome de Bloom

Enfermedad autosómica recesiva, caracterizada por telangiectasias faciales y machas café con leche, retraso de crecimiento, inmunodeficiencia, enfermedad pulmonar crónica y mayor riesgo de desarrollar neoplasias (leucemias agudas, linfomas no Hodgkin, OSM, carcinomas cutáneos, nefroblastomas y tumores gastrointestinales). El gen implicado *BLM* está localizado en la región cromosómica 15q26.1. La proteína codificada por este gen es una helicasa y por lo tanto participa en la replicación y reparación de DNA. El déficit en la reparación de las mutaciones de los nucleótidos origina el desarrollo de las neoplasias típicas de este síndrome.

1.3.5.6 Anemia de Diamond-Blackfan

Enfermedad rara que se caracteriza por aplasia pura eritropoyética, predominio del período pediátrico y mayor riesgo de desarrollar neoplasias hematológicas, OSM y carcinomas. Esta enfermedad puede ser causada por mutaciones en los siguientes genes, *RPL5*, *RPL11*, *RPL35A*, *RPS7*, *RPS10*, *RPS17*, *RPS19*, *RPS24* y *RPS26*. El más frecuente es *RPS19* localizado en la región cromosómica 19q13.2 y detectado en el 25% de pacientes. Estos genes codifican para proteínas

ribosomales. Las mutaciones en estos genes resultarían en disminución de la estabilidad o función de las proteínas ribosomales.

1.3.5.7. Osteosarcoma familiar

Al menos 10 familias se han descrito con presencia de OSM sin antecedentes neoplásicos, ni segundos tumores en los supervivientes. Aunque en algunas muestras tumorales se han documentado las alteraciones citogenéticas típicas del OSM, en las células restantes, incluidas las germinales, no se han detectado las alteraciones genéticas implicadas en los síndromes asociados. Sin embargo, es importante señalar que los casos reportados de OSM familiar son escasos y en la mayoría de ellos no se realizó ningún estudio genético para la identificación de mutaciones causarles (6).

1.4. Bases genéticas y moleculares del OSM

1.4.1. Nivel cromosómico

El OSM es caracterizado por un cariotipo complejo, los pacientes exhiben altos grados de aneuploidía con hasta un máximo de 16 cromosomas alterados, mostrando amplificaciones genéticas, múltiples desbalances y rearrreglos cromosómicos. Sin embargo, el aprovechamiento de varias técnicas moleculares citogenéticas han permitido el análisis y descripción del complejo cariotipo de OSM. Las alteraciones cromosómicas más frecuentes en OSM convencional son pérdidas de porciones de los cromosomas 3q, 6q, 9, 10, 13, 17p y 18q y ganancias en porciones de los cromosomas 1p, 1q, 6p, 8q y 17p (Tabla 1). En un estudio realizado por Smida J *et al.* (14) donde se analizaron 45 muestras de OSM, se observó que en casi el 50% de éstas había pérdida de la heterocigosidad (LOH, por sus siglas en inglés), particularmente los datos indicaron que 41% de los casos con LOH presentaron pérdida alélica o cromosómica y las ganancias incluyeron eventos de duplicación, además de la disminución en el número de copias en 22 de las 45 muestras del estudio hasta en seis cromosomas, donde los más frecuentemente afectados eran los cromosomas 2, 3, 5, 6, 10, 13 (14); al

respecto Himilstein *et al.* (15) reportaron LOH en la región cromosómica 3q específicamente para el gen *RB1* y en el cromosoma 13q en la localización correspondiente al gen TP53. A su vez, las anomalías cromosómicas analizadas por Sharon (2) estuvieron relacionadas con pérdidas y ganancias alélicas incluyendo eventos de duplicación o pérdida cromosómica.

Sin embargo, existen grandes discrepancias entre los estudios publicados, lo cual puede deberse a las siguientes razones: inconsistencias en la metodología (resolución de técnicas citogenéticas y plataformas, variación de las cohortes, estadio, subtipo histológico y tamaño muestral y exposición a quimioterapia), baja incidencia de la enfermedad y finalmente se sabe que el OSM tiene un alto nivel de inestabilidad cromosómica colaborando con la heterogeneidad intra e intertumoral (1).

Se han establecido dos procesos distintos que gobiernan la estabilidad genómica de las células en este tipo de cáncer: el que afecta la segregación y ploidía de la cromosomas y la afección de la fidelidad de replicación y reparación de ADN que conducen a aberraciones en la estructura y número cromosómico. La complejidad del OSM es consecuencia de la inestabilidad cromosómica generada por ambos procesos. El mantenimiento telomérico es otro recurso de la inestabilidad típica en el OSM, que además se asocia a una reducción de la probabilidad de una respuesta favorable en los pacientes con este padecimiento (6).

Tabla 1. Alteraciones cromosómicas más frecuentes en OSM convencional

Región genómica	Evento	Frecuencia	Genes supresores	Oncogenes	Referencias
1q10-q12, 1q21-q31	Amp	6–59%			[50, 55, 77, 82–84]
3q13.31	Del, LOH	6–80%	LSAMP		[44, 45, 49–55]
5q21	LOH	62%	APC		109
6p12-p21	Gan, Amp	16–75%		RUNX2, CDC5L, VEGFA, PIM1	[9, 20, 45, 49, 65, 77, 78, 82, 89-92]
6p22.3	Gan, Amp	60%		E2F3	[92]

7p21	Del	36%		TWIST	[109]
	Amp	14%		MET	
7q31	Del	41%			
	Amp	9%			
8q24.21	Amp	7–67%		MYC	[20, 45, 49, 55, 71, 78, 81–83]
8q24.4	Mut	<5%	RECQL4		[85]
	Gan	33%	RECQL4		[27]
9p21	Del	5–21%	p16/INK4A, p14/ARF, p15/INK4B		[48, 60–63]
10q26	LOH	60%	BUB3, FGFR2		[106]
12q13	Amp	41%		PRIM1	[58]
12q14	Amp	10%		CDK4	[45, 57]
12q15	Amp	3–25%		MDM2	[47, 48, 57, 72, 73]
13q14.2	LOH	19–67%	RB1		[43–55]
	Mut	25–35%	RB1		[46, 56]
16q23.1–q23.2	Del	30%	WWOX		107]
17p11.2–p12 20–	Amp	78%	COPS3, PMP22, MAPK7		[20, 49, 52, 55, 65, 68, 70, 75–80]
17p13.1	Del,	29–42%	TP53		[44, 62, 65]
	LOH				25, 44, 47, 48, 56, 62, 67–
	Mut	10–39%			71]
18q (RMC 18q21– q23) 31–	Del	64%			[44, 53, 110, 114]

RMC: región mínima común; Del: delección; Amp: amplificación; Mut: mutación; Gan: Ganancia

Tomado de *The Genetics of Osteosarcoma*, Jeff W.Martin, Jeremy A. Squire y Maria Zielenska. Sarcoma, 2012, ID del artículo 627254, 11 páginas.

Las anomalías cromosómicas analizadas por Smida *et al.* (14) estuvieron relacionadas por pérdidas y ganancias alélicas incluyendo eventos de duplicación y pérdida cromosomal. La gran mayoría de los genomas analizados en este estudio presentaron LOH y CNV (variación en el número de copias por sus siglas en inglés), lo que es un indicador de un alto grado de aberraciones cromosomales y desbalance alélico. Las variaciones cromosomales fueron significativas, especialmente LOH observada en tumores con escasa respuesta a tratamiento comparado con aquellos tumores que tuvieron buena respuesta a la quimioterapia preoperatoria. Se propone por otra parte que a través del sistema

para la evaluación de los estados de alteración cromosómica (CAS) se puede predecir el pronóstico de los pacientes con OSM al momento del diagnóstico (14).

En relación con el subtipo histológico, en el subtipo telangiectásico se consideran principalmente alteraciones numéricas cromosómicas en comparación con otros subtipos y mutaciones en *TP53* con la mutación más frecuente. El OSM de células pequeñas es un subtipo que citogenéticamente presenta características individuales, como normalidad en *TP53*, *RB1*, *MDM2*. En el caso del OSM periosteal, los resultados obtenidos no han sido consistentes, pero de las células estudiadas en estos casos se encontró una copia adicional del cromosoma 17. Algunos otros estudios han reportado ganancias en el cromosoma 2q, 5p, 8q, 14 y 21, pérdidas cromosómicas se han identificado en 6, 8p y 13, además de mutaciones puntuales en *TP53*. El OSM superficial de alto grado, se ha asociado con amplificaciones a nivel genético con localización específica en el cromosoma 12q14.3-15 reportado en un solo caso de alto grado superficial y seis casos de grado superficial (1).

1.4.2. Nivel génico

1.4.2.1. *RB1*

Retinoblastoma 1, localizado en la región 13q14.2. La proteína codificada por este gen es regulador negativo del ciclo celular y es el primer gen supresor de tumor identificado. La proteína codificada también lleva a cabo funciones de mantenimiento de la estructura de la cromatina y estabiliza la heterocromatina constitutiva. Defectos en este gen causan retinoblastoma, cáncer de vejiga y sarcoma osteogénico y el porcentaje de casos de OSM en relación con mutación en este gen es de hasta el 35 y 67% de los casos con LOH (16).

1.4.2.2. *CDK4*

Ciclina dependiente de cinasa 4, ubicado en la región 12q4. Gen que codifica para proteína serina/treonina, miembro de la familia de cinasas, corresponde a una subunidad catalítica de una proteína cinasa compleja que es importante en el ciclo celular durante la progresión de la fase G1. Se considera responsable de la fosforilación del producto del gen retinoblastoma, rearrreglos en este gen

pueden conducir a sobreexpresión de Cdk6 en linfoma, leucemia y melanoma. Se ha observado su expresión con técnicas de inmunohistoquímica en OSM de bajo grado.

1.4.2.3. PRIM1

Primasa, DNA, polipéptido, ubicado en la región 12q13. Componente enzimático clave para conducir a la formación de un complejo aparato de replicación cromosomal. Primasa heterodimera compuesta de pequeñas subunidades que sintetiza RNA y *primers* durante la síntesis de fragmentos de Okasaki durante la replicación de DNA, implicado también en diferentes fases del ciclo celular, G1 a S; en OSM se ha visto amplificado en un 41% de los casos.

1.4.2.4. CDKN2A/p16

Inhibidor ciclina dependiente de cinasa 2A, ubicado en la región 9p21.3. Gen que genera transcritos alternativos, su producto funcional estabiliza a p53 pudiendo interactuar con él o secuestrarlo. Interviene funcionalmente en la fase G1 del ciclo celular. En cáncer de mama se ha visto un incremento en su expresión, a su vez variaciones en este gen se asocian con carcinoma escamo-celular y progresión de enfermedad en rhabdomyosarcoma. En OSM se usa como biomarcador debido a que su expresión a nivel inmunohistoquímico se asocia con respuesta a quimioterapia.

1.4.2.5. TP53

Proteína tumor p53, localizado en la región 17p13.1; gen que codifica para proteína supresora de tumor de unión a DNA y dominios de oligomerización. Implicado en la activación de la transcripción, responde a diversas formas de estrés celular, induce arresto del ciclo celular, apoptosis, senescencia, reparación de DNA, cambios y metabolismo celular. En cáncer se asocia con síndrome de Li-Fraumeni en casos de inactivación directa de TP53 a nivel postranscripcional. En OSM se observa desregulación y se asocia con incremento en la incidencia LOH hasta un 42% de los casos, por lo que se piensa que juega un papel importante durante su tumorigénesis.

1.4.2.6. MDM2

Oncogen proteína ubiquitina ligasa de E3 ubicada en la región 12q14.3 y codifica para la ligasa ubiquitina E3 de localización nuclear. Puede conducir a la formación de proteínas supresoras de tumor como p53, se autorregula a nivel transcripcional. La sobreexpresión o amplificación de este *locus* se ha asociado a diferentes tipos de cáncer debido a su actividad de generación de edición alternativa que resulta en variantes transcripcionales que se expresan en células tumorales. En OSM se reporta su amplificación hasta 25% de los casos.

1.4.2.7. COPS3

Señalamos subunidad 3 constitutivo fotomorfogénico ubicado en la región 17p11.2, de actividad proteasa que regula la fosforilación, implicado en señales de transducción, codificante de un componente del proteosoma. En cáncer induce el arresto del crecimiento y apoptosis en carcinoma hepatocelular. En OSM su inhibición resulta en la reducción de proliferación y migración de células, también se sugiere su sobreexpresión en asociación con metástasis de esta misma entidad.

1.4.2.8. C-MYC

Oncogen homólogo del virus de mielocitomatosis aviar, localizado en la región 8q24.21. La proteína codificada por este gen es multifuncional, es una fosfoproteína que juega un papel importante en la progresión del ciclo celular, apoptosis y transformación celular. Actúa como factor de transcripción para algunos genes. En cáncer su sobreexpresión y translocación se ha sido asociado con una variedad de tumores hematopoyéticos, leucemias y linfomas. En OSM se observa amplificación, rearrreglos y mutaciones que a su vez se asocian con la patogénesis de este tumor y el desarrollo de metástasis.

1.4.2.9. RECQL4, RECQL3, RECQL2

Proteína parecida a RecQ4, 3 y 2, localizada 8q24.3, codifica para proteínas que pertenecen a la familia RecQ helicasas. REQL4 codifica una helicasa de DNA que relaja la doble cadena de DNA de cadena sencilla y puede modular la segregación

cromosómica. RECQL3 y 2 están implicados en aspectos metabólicos, incluyendo transcripción, replicación, recombinación y reparación. Defectos en este gen son causa de síndrome de Werner. RECQL4 presenta aberraciones que se asocian con el desarrollo de OSM, reportándose ganancias en mayor porcentaje y mutaciones puntuales hasta en 5% de los casos. RECQL3 se encuentra mutado invariablemente en casos de síndrome de Werner y presenta alteraciones en el número de copias en las regiones del 15q u 8p en los casos de OSM.

1.4.2.10. E2F3

Factor de transcripción 3 (E2F), localizado en la región 6p22.3. Gen que codifica para un miembro de la pequeña familia de los factores de transcripción, que funcionan a través de su unión a proteínas asociadas. La proteína codificada reconoce una secuencia motivo en DNA e interactúa directamente con proteína RB para regular la expresión de genes implicados en el ciclo celular. Alteraciones en el número de copias y la actividad de este gen ha sido observado en diferentes tipos de cáncer. En OSM se reportan ganancias y amplificaciones en el 60% de los OSM.

1.4.2.11. VEGFA

Factor de crecimiento endotelio vascular A, localizado en la región 6q21. Este gen es miembro de la familia de los factores de crecimiento PDGF/VEGF y codifica una proteína glicosilada que actúa en células endoteliales, induciendo su crecimiento, incrementando la permeabilidad vascular, induciendo angiogénesis, vasculogénesis y promueve migración celular e inhibe apoptosis. En OSM se ha reportado su amplificación hasta en el 25% de los casos, relacionándose con crecimiento tumoral y la maduración de vasos en el tumor, producto de angiogénesis.

1.4.2.12. RUNX2

Factor 2 de transcripción de baja afinidad, localizado en la región 6p21. Miembro de la familia de factores de transcripción RUNX que codifican proteínas nucleares con dominio de adhesión a DNA. Esta proteína es esencial durante la

diferenciación osteoblástica y morfogénesis esquelética, actúa como andamio de ácidos nucleicos y factores regulatorios implicados en la expresión de genes. Se han reportado ganancias y sobreexpresión en este gen hasta en un 87% de los especímenes de OSM y se ha relacionado con escasa respuesta a quimioterapia.

1.4.2.13. CCND3

Ciclina D3, localizado en la región 6p21. Se caracteriza por su abundancia durante el ciclo celular, son reguladores de cinasas CDK, coordinan el evento mitótico, forman complejos y funcionan como reguladores de las subunidades CDK4, CDK6 que tienen durante la transición de G1 a S del ciclo celular e interactúa con Rb.

1.4.2.14. APC

Poliposis adenomatosa Coli, localizado en la región 5q22.2. Codifica para proteína supresora tumoral que actúa como antagonista de Wnt, implicado en otros procesos que incluyen migración, adhesión, activación transcripcional y apoptosis. Defectos en este gen están asociados con poliposis adenomatosa familiar (FAP) y lesiones premalignas. Presenta LOH hasta en 62% de los casos de OSM.

1.4.2.15. TWIST

Factor de transcripción de estructura básica hélice-vuelta-hélice (bHLH), localizado en 7p21.1. Ha sido implicado en la determinación del linaje y diferenciación celulares, se expresa de forma importante como RNAm en tejido placentario, en adultos en tejidos de origen mesodérmico. Mutaciones en este gen han sido reportadas en pacientes síndrome de Saethre-Chotzen. En OSM se ha reportado amplificación hasta en 14% de los casos.

1.4.2.16. MET

Protooncogen MET, localizado en la región 7q31.2. Se trata de un producto del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (*HGF*) identificando hasta ahora dos isoformas, regula la actividad de la tirosina-cinasa, la proteína precursora de cadena sencilla es fragmentada a nivel postranscripcional para

producir sus subunidades alfa y beta. Mutaciones en este gen se han asociado con carcinoma papilar renal. En OSM se encuentra amplificado en 9% de los casos y deletado en más del 40%.

Tabla 2. Genes asociados a osteosarcoma

GEN	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN	ASOCIACIÓN CLÍNICA	AUTOR/AÑO
P53	17p13.1	Gen supresor tumoral. Codifica proteína supresora, regula activación transcripcional y la unión a DNA.	Implicado en la tumorigénesis del OSM.	Broadhead <i>et al.</i> 2011 (16)
RB1	13q14.2	Gen supresor de tumor. Regulador negativo del ciclo celular, proteínas estabilizadoras de la constitución y mantenimiento de cromatina.	Deleciones y rearrreglos en este gen se asocian con pérdida del punto de inicio para G1 del ciclo celular.	Broadhead <i>et al.</i> 2011 (16)
P21	6p21.2	Codifica para una proteína que inhibe la actividad de los complejos de ciclina CDK2 y CDK4.	Amplificación asociada con el crecimiento tumoral.	Martin <i>et al.</i> 2012 (1)
MYC	8q24.21	Factor transcripcional que codifica para un gen implicado en la progresión del ciclo celular, apoptosis y transformación celular.	Amplificación, aumento en el número de copias, relacionados con tumores en pacientes adultos.	Martin <i>et al.</i> 2012 (1)
EZR	6q25.3	Proteína estructural de la membrana plasmática, ubicada entre la membrana plasmática y actina del citoesqueleto. Miembro de la familia de proteínas ERM.	Amplificación relacionada con el desarrollo de metástasis temprana.	Squire <i>et al.</i> 2003 (17)
VEGFA	6p21.1	Miembro de la familia de factores de crecimiento PDGF/VEGF. Actúa exclusivamente en células endoteliales.	Amplificado hasta en 25% de los especímenes de OSM, producto de los promotores de angiogénesis y permeabilidad vascular.	Martin, <i>et al.</i> 2012 (1) Yang <i>et al.</i> 2011 (18)
CD4	12p13.31	Subunidad catalítica de una proteína cinasa compleja que es importante en el ciclo celular durante la progresión de la fase G1.	Expresión con técnicas de inmunohistoquímica en OSM de bajo grado.	Martin <i>et al.</i> 2012 (1)
MDM2	12q15	Codifica para E3 ubiquitina ligasa, puede conducir a la formación de proteínas supresoras de tumor como p53, se autorregula a nivel transcripcional.	Amplificación especialmente en OSM parosteal.	Martin <i>et al.</i> 2012 (1)
PRIM1	12q13		Amplificación en 41% de los casos.	Martin <i>et al.</i> 2012 (1)

RECQL4,	8q24.4	Rrelaja la doble cadena de ADN de cadena sencilla y pueden modular la segregación cromosómica.	Presenta ganancias menores a 5% y hasta el 33% respectivamente.	Martin <i>et al.</i> 2012 (1)
E2F3	6p22.3	Codifica un miembro de una pequeña familia de factores de transcripción, interactúa con RB1 que regulan la expresión de genes implicados en el ciclo celular.	Presenta ganancias o amplificaciones en OSM.	Martin <i>et al.</i> 2012 (1)
RUNX2	6p12-p21	Esencial durante la diferenciación osteoblástica y morfogénesis esquelética, actúa como andamio de ácidos nucleicos y factores regulatorios implicados en la expresión de genes.	Aumento en la expresión.	Martin <i>et al.</i> 2012 (1)
CCND3	6p21.1	Regulador de cinasas CDK, coordinan el evento mitótico, forman complejos y funcionan como reguladores de la subunidades CDK4, CDK6 que tienen actividad durante la transición de G1 a S del ciclo celular.	Comúnmente amplificado en OSM.	Martin <i>et al.</i> 2012 (1)
APC	5q21	Implicado en procesos que incluyen migración, adhesión, activación transcripcional y apoptosis.	En OSM presenta LOH y ganancias hasta en el 62% de los casos.	Martin <i>et al.</i> 2012 (1)
TWIST	7q21	Factor de transcripción que ha sido implicado en la determinación del linaje y diferenciación celulares.	Se observa amplificado hasta en 14% de los casos de OSM.	Martin <i>et al.</i> 2012 (1)
MET	7q31	Factor de crecimiento de hepatocitos (<i>HGF</i>) y se han identificado hasta ahora dos isoformas.	Deletado hasta el 41% de los casos.	Martin <i>et al.</i> 2012 (1).

1.5. Secuenciación de Nueva Generación (SNG)

La secuenciación del genoma tiene como finalidad determinar el orden en la secuencia de los nucleótidos. Una de las tecnologías de secuenciación más utilizadas es la de Sanger, para la que se requieren de cuatro reacciones separadas para cada nucleótido y un proceso de desnaturalización y separación por tamaño en un gel de poliacrilamida, este método ha sido sometido a modificaciones generando nuevas formas de secuenciación a través del uso de métodos que paralelizan el proceso de secuenciación, produciendo miles o

millones de secuencias en menor tiempo, con menor costo y mayor precisión del método (19). El proyecto del genoma humano llevó un total de 13 años y tuvo un costo aproximado de 3,000 millones de dólares. El costo de secuenciación con el doble de rendimiento en cinco meses es para el 2010 de 1 millón pb/\$ (dólar estadounidense), de acuerdo con lo reportado por Stein *et al.* (20) Esta tecnología sigue evolucionando de manera que con tecnologías de secuenciación masiva en paralelo se ha proyectado la obtención de 1,000,000,000 kilobases por día por máquina (21).

Las metodologías de secuenciación de “nueva generación” o “paralelas-masivas” se refieren a las tecnologías capaces de secuenciar grandes cantidades de fragmentos de DNA en una sola reacción. Todas estas tecnologías monitorizan la adición secuencial de nucleótidos a templados de DNA inmovilizados y arreglados espacialmente. Pero difieren en cómo estos templados son generados y cómo se interrogan las secuencias. En algunas se utilizan pasos iniciales de clonación, como RCP en puente, desarrollado y usado por Solexa (Illumina), donde los fragmentos se amplifican a partir de cebadores unidos a una superficie sólida. Estos métodos son más eficientes en tiempo, costo y sensibilidad, además de que son un método de terminador reversible usado por los nuevos secuenciadores de Illumina como HiSeq, que utiliza versiones reversibles de terminadores marcados añadiendo un nucleótido cada vez, permitiendo ver el nucleótido correspondiente a esa posición y removiendo posteriormente el grupo de bloqueo para permitir la polimerización de otro nucleótido (22).

Tabla 3 Comparación de tecnologías de SNG

Plataforma de secuenciación	Preparación del templado/librería	Química de la reacción de secuenciación	Máximo de longitud de lectura, bp	Tiempo de corrida	Máximo de rendimiento por corrida (secuencia total de pb)	Fortalezas	Limitaciones
Illumina HiSeq 2000	Amplificación en puente	Terminación reversa	100	2*, 11°	95-600 Gb	Plataforma usada más extensamente, alto rendimiento	Todas las muestras son secuenciadas en celdas de flujo para ser leídas al mismo tiempo
Illumina	Amplificación	Terminación	250	0.17*,	440 Mb – 7	Corto tiempo	Bajo número de

MiSeq	en puente	reversa		1.1°	Gb	de corrida	lecturas totales (~15 millones)
Roche genome sequencer FLX	PCR en emulsión	Pirosecuenciación	400	0.4	0.5-0.6 Gb	Grandes lecturas, rápido tiempo de corrida	Bajo número lecturas (~11 millones)
SoLID/ABI 5500	PCR en emulsión	Ligación de secuencia	75	2*, 7°	90-300 Gb	Carriles de flujo celular independientes	Corta longitud de lecturas
Ion personal genome machine	PCR en emulsión	Ion de secuenciación	200	0.1	1 Gb	Corto tiempo de corrida, máquina escalable a bajo costo	Bajo número lecturas (~11 millones)
Complete genomics	Nanoesferas PCR en DNA	Ligación de secuencias	70	12	20-60 Gb	Servicio completo para secuenciación humana	Alto costo por muestra, sólo validado por resecuenciación humana
Helicos	Molécula individual	Terminación reversa	55	8	21-35 Gb	No amplificaciones parciales	Máquina no usada extensamente, servicio de secuenciación validado a través de la compañía
PacBio RS	Molécula individual	Tiempo real	1,000	<0.1*	N/A	Potencial para grandes lecturas y corto tiempo de corrido	Alta tasa de error

1.6. Aplicaciones de la SNG para el estudio del cáncer hereditario

El desarrollo de cáncer está directamente asociado con alteraciones en el genoma, por lo tanto uno de los principales propósitos de la investigación en esta área ha sido su identificación y asociación con los diferentes procesos asociados a la transformación de células normales hacia un fenotipo canceroso. Tradicionalmente, la investigación en cáncer se ha enfocado a estudiar un solo gen a una sola vía, sin embargo, sabemos que el cáncer es una enfermedad compleja que involucra múltiples genes y vías. Es por esto que un análisis global del genoma del cáncer y su estructura podría ser una herramienta fundamental para el entendimiento de su patogénesis, así como para un mejor diagnóstico y selección del tratamiento (1).

La secuenciación de nueva generación (NSG) es capaz de generar un panorama general del complejo genoma de los tumores ya que permite la identificación de diversas formas de aberraciones somáticas, incluyendo mutaciones de un solo nucleótido a nivel genómico, inserciones y deleciones, CNV y rearrreglos cromosómicos, así como caracterizar el transcriptoma y epigenoma. Además, tiene la capacidad de identificar subclonas genéticas en una población de células de cáncer, así como detección de secuencias de virus insertados en el genoma (21).

Los estudios publicados en SNG en diversos tipos de cáncer incluyendo mama, de ovario, colorrectal, pulmonar, cabeza y cuello, etc. Han permitido identificar nuevas alteraciones genéticas que contribuyen a la oncogénesis, progresión y metástasis de estos tumores así como comprender y estudiar la complejidad, heterogeneidad y evolución de los tumores (23). El acceso a esta tecnología ha estimulado la colaboración de diversos grupos para crear catálogos de mutaciones en diferentes tipos de cáncer, entre los proyectos más importantes se encuentran International Genome Consortium (ICGC) y The Cancer Genome Atlas (TCGA) Project (24).

La sospecha de cáncer hereditario en un paciente se considera cuando se cumplen los siguientes criterios: 1) El cáncer se diagnostica a una edad inusualmente temprana; 2) la misma persona ha presentado diferentes tipos de cáncer; 3) el cáncer se ha desarrollado en ambos órganos en aquellos que son pares, como riñones, mamas, etcétera; 4) varios parientes sanguíneos han tenido el mismo tipo de cáncer; 5) casos inusuales de un tipo específico de cáncer (por ejemplo, cáncer de mama en un hombre); 6) presencia de defectos de nacimiento, asociados a ciertos síndromes de cáncer hereditario; 7) ser miembro de algún grupo racial/étnico que se conoce con riesgo para ciertos síndromes de cáncer hereditario.

Estudios recientes sugieren que hasta un 30% de los niños con cáncer pueden tener mutaciones genéticas que predisponen al desarrollo de cáncer a una edad temprana. Cuando existe la sospecha de un síndrome de cáncer hereditario, la identificación de las mutaciones causales conocidas es crítica ya que permite el diagnóstico preciso.

Se han reportado por lo menos 100 genes de susceptibilidad a cáncer, la secuenciación de cada uno de estos genes por métodos convencionales sería excesivamente costosa, lenta y no permitiría la identificación de mutaciones en nuevos genes de susceptibilidad a cáncer. Además de que la mayoría de estas pruebas genéticas no están estandarizadas en México.

La SNG principalmente del exoma (secuenciación de regiones codificantes) puede ayudar a determinar cuál mutación es la causante del cáncer del paciente. La SNG es un método robusto y accesible que puede suplantar las pruebas genéticas utilizadas actualmente, al ser esta tecnología menos costosa que realizar secuenciación secuencial de genes individuales. Por otra parte, el acoplamiento de la SNG con métodos para enriquecimiento de secuencias ha permitido la secuenciación dirigida de paneles de genes. Este abordaje se ha utilizado para el diagnóstico de síndrome de Lynch, además de cáncer de mama y ovario hereditario por utilizar oligonucleótidos diseñados para enriquecer los diferentes genes asociados a estas patologías (25).

En las situaciones donde hasta el momento se desconocen las alteraciones genéticas causales, la secuenciación de genoma completo o de exoma pueden ayudar a identificarlas, así como en aquellos casos donde existe un alto grado de heterogeneidad genética, de *locus* o alélica. Los estudios de ligamiento o mapeo homocigótico pueden identificar regiones que contienen múltiples genes candidatos, por lo tanto se requieren conocimientos previos acerca de las funciones de los genes y posibles mecanismos de la enfermedad para poder seleccionar y clasificar a los candidatos. Este proceso puede acelerarse a través de utilizar SNG y tiene como ventajas que es una herramienta que permite de la detección de mutaciones de una manera exhaustiva y no sesgada. Además permite la detección de variantes estructurales las cuales no pueden ser identificadas por secuenciación convencional (26), (27) y (28).

2. Presentación del caso

2.1. Caso 1 (5200000000041)

Individuo de sexo masculino de nueve años originario de Michoacán. En el momento del diagnóstico se niegan otros antecedentes familiares de importancia, se interrogó particularmente acerca de otros casos de cáncer en la familia, lo cual se negó, así como de enfermedades óseas congénitas. Presenta cuadro de cuatro meses de evolución (24/01/07) al notar aumento de volumen en la cara anterior de la pierna izquierda. Refiere antecedente de traumatismo un mes previo con bicicleta acompañado de dolor y equimosis sin incremento de volumen. Debido al incremento progresivo del tamaño acude con un médico particular (traumatólogo) después de dos meses de la aparición de masa y es referido al INP, donde se toma una biopsia que reporta patología, con el diagnóstico de osteosarcoma osteogénico. En estudios de extensión no se encontraron metástasis pulmonares.

- Exploración Física: Asimetría en piernas, a nivel de tercio superior de pierna izquierda se nota incremento de volumen con perímetro a este nivel de 28 cm en comparación con la otra pierna de 27 cm; la piel sobre la tumoración se encontró con discreto aumento de la temperatura. La tumoración fue de aproximadamente 5x4x2 cm, bien delimitada, dura al tacto, dolorosa a la palpación, adherida a planos profundos, no se palparon pulsos.
- Estudios Imagen: RM de extremidad: Lesión metafisiaria proximal de la tibia izquierda. TAC Tórax: Normal
- Tratamiento: Quimioterapia neoadyuvante CDDP/DOX, MTX, CFM/VP16. Adyuvante: MTX, IFOS/DOX.
- Cirugía: 21-06-2007 amputación mesocrural. Evolución favorable inicia vigilancia en enero del 2008.
- Reportes de patología: 1) Biopsia: descripción macroscópica: biopsia de hueso de tibia de 0.5 cm x 0.3 cm, cilíndrica de color café oscuro de

aspecto rugoso de consistencia dura. Descripción microscópica: fragmentos de hueso con vesículas engrosadas y escleróticas, entre las cuales se encontró una neoplasia formada por osteoblastos malignos con formación de osteoide inmaduro localizado en espacios medulares. Diagnóstico: osteosarcoma osteogénico. 2) Amputación: diagnóstico: amputación de miembro inferior izquierdo: osteosarcoma osteoblástico en tibia con necrosis (20%), bordes quirúrgicos positivos y médula ósea libre de neoplasia.

2.2. Caso 2 (5200000000042)

Individuo masculino de 17 años que se presenta con cuadro de tres meses de evolución caracterizado por dolor hasta limitar la deambulacion, aumento de volumen en rodilla derecha, pérdida de peso, recibió tratamiento a base de medios físicos, antiinflamatorios y analgésicos, por falta de mejoría se toma biopsia de la lesión diagnosticándose como osteosarcoma osteogénico.

- Exploración Física: se encontró tumoración con un diámetro de 43 cm en tercio inferior proximal de tibia derecha, dolorosa a la palpación, con hiperemia e hipertermia, cicatriz quirúrgica antigua y discretamente vascularizada. Adenomegalias inguinales derechas múltiples con dolor a la palpación variables en sus diámetros de 0.5 cm hasta 1.5 cm.
- Estudios de Imagen: TAC pulmonar: múltiples imágenes nodulares. RMN: demostró extensa lesión dependiente de la diáfisis proximal de la tibia derecha, con leve extensión medular y gran componente de tejidos blandos. La centellografía ósea presentó una lesión en tercio proximal y medio de tibia derecha, tobillo derecho.
- Tratamiento: Recibió un ciclo CDDP/DOX y posteriormente se decide amputación de la extremidad. Continuó con CDDP/DOX, pero se decide cambiar el tratamiento debido a que se encontraron nuevas lesiones pulmonares y se inicia con CFM/VP16. Se le realizó al paciente una toracotomía posterolateral derecha por neumotórax y enfisema. Después

de tres meses se observa incremento del número de lesiones pulmonares, por lo que sale de tratamiento y fallece en su hogar.

- Reportes de patología: 1) Amputación: osteosarcoma osteoblástico en tercio medio y proximal de tibia que mide 16.9x10.9 cm, infiltración extensa a tejidos blandos, necrosis tumoral del 60%, tumor viable del 40%, grado 2 (mod. De HUVOS), márgenes quirúrgicos amplios y negativos para neoplasia maligna.

Debido a la presentación de osteosarcoma en dos hermanos es valorado por el servicio de Genética del INP y se toma muestra para descartar síndrome de Li-Fraumeni, evaluando mutaciones en p53. Sin embargo, el estudio descarta mutaciones en línea germinal de los pacientes y la familia. La familia niega antecedentes de cáncer y otras enfermedades de importancia.

2.3. Árbol genealógico

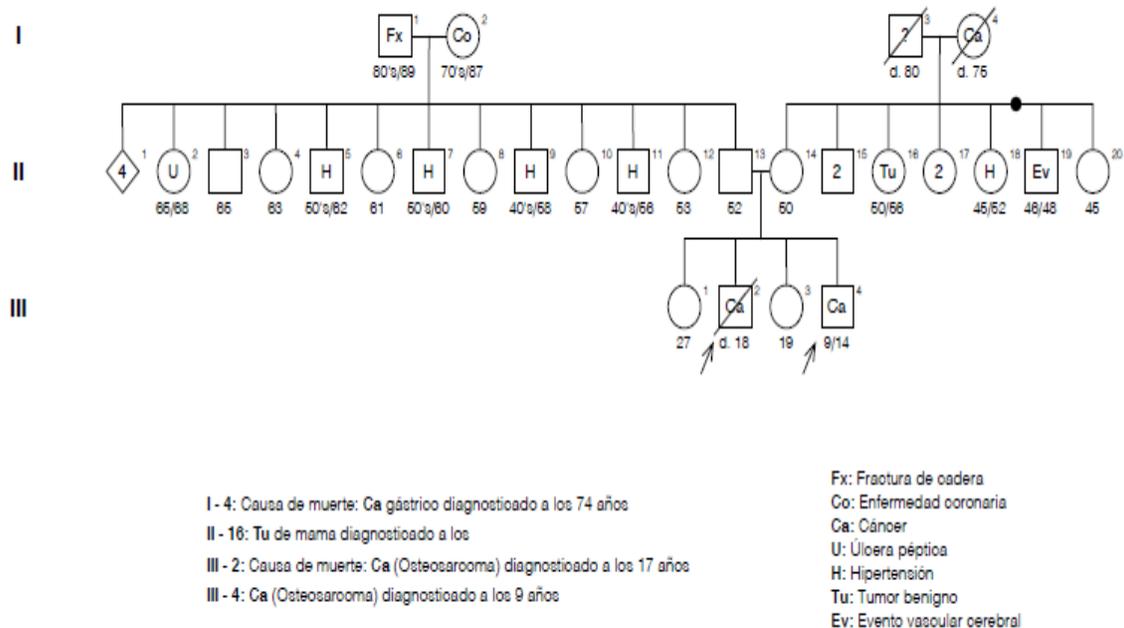


Figura 1. Árbol genealógico

Cuadros-masculinos
 Círculos-femeninos
 Línea a través del símbolo-individuo muerto
 Símbolo obscuro-individuo clínicamente afectado

Úlcera gástrica
 *Derrame cerebral; quiste de mama
 ** Fractura de cadera postraumática
 *** Paro cardíaco-cáncer de estómago

3. Justificación

Existen diversos reportes de agregación familiar de OSM, en una minoría de estas familias se han identificado genes de susceptibilidad que incluyen: P53, RB1, CHK2. Sin embargo, las bases genéticas en la mayoría de estas familias con probable cáncer hereditario son desconocidas. La concurrencia de casos en una familia se puede deber a varios factores, como son genéticos, ambientales y aleatorios. La identificación de variantes genéticas en casos sugestivos de cáncer hereditario es muy importante, ya que tiene implicaciones en la prevención y tratamiento temprano de los cánceres asociados en cada uno de los síndromes.

Por lo tanto es imprescindible contar con una herramienta precisa, robusta y costo-efectiva para identificar estas alteraciones genéticas que contribuyen a la susceptibilidad del cáncer. La secuenciación de genoma o exoma ofrece ventajas sobre métodos convencionales, ya que por una parte ofrece un exhaustivo análisis de mutaciones no sesgado y además puede identificar alteraciones estructurales. Estudios de los últimos años han demostrado el impacto potencial de la secuenciación de nueva generación para el estudio de enfermedades mendelianas y complejas, como es el cáncer.

4. Planteamiento del problema

La identificación de pacientes con síndromes de susceptibilidad a cáncer facilita el diagnóstico temprano, prevención y tratamiento. Sin embargo, en muchos casos la historia familiar no es clara y las pruebas genéticas convencionales y accesibles no logran identificar la mutación causal. ¿La secuenciación de nueva generación puede ayudar a la identificación de las mutaciones causales en casos de sospecha de osteosarcoma familiar?

5. Objetivos

Objetivo general

Identificación de las mutaciones germinales raras o nuevas en genes de susceptibilidad a cáncer antes descrito en un paciente con probable osteosarcoma familiar mediante secuenciación de genoma y exoma.

Objetivos particulares

- Analizar el perfil de mutaciones a partir de muestras de muestras de dos pacientes hermanos con diagnóstico de OSM que se contrastarán el perfil de mutaciones en tejido normal (muestra de sangre periférica) del mismo paciente y de su familia.
- Realizar un análisis de las mutaciones identificadas en el DNA de las muestras de tumor de toda la familia con el perfil de mutaciones de otras cinco muestras de pacientes pediátricos mexicanos con diagnóstico de OSM esporádico y su respectiva muestra de tejido normal (sangre periférica).

6. Hipótesis

La secuenciación de nueva generación puede identificar nuevas variantes crípticas en genes de susceptibilidad a cáncer, además de dar información no sesgada de todo el espectro de mutaciones del genoma, basado en perfil genético del paciente.

7. Metodología

7.1. Tipo de estudio

Observacional, descriptivo, transversal, comparativo, no probabilístico; se utiliza una muestra de conveniencia, reporte de dos casos índice y su familia, cinco muestras de OSM esporádico, 15 casos provenientes de España y 39 de Brasil.

7.2. Reclutamiento de pacientes

Los pacientes y sus familiares fueron invitados a participar en el estudio y firmaron el consentimiento incluyendo autorización para la obtención de muestras. El estudio fue autorizado por las comisiones de ética del Instituto Nacional de Pediatría y del Inmegen.

7.3. Recolección y toma de muestras

De los dos pacientes con diagnóstico de OSM del Instituto Nacional de Pediatría, se obtuvo una muestra de tejido primario durante la toma de biopsia para realizar el diagnóstico correspondiente, además se solicitó muestra de sangre periférica (2 tubos con EDTA de 6 ml cada uno), que es considerado el tejido normal con el que se contrastará el perfil de mutaciones de la muestra de tumor. En el caso de los familiares se obtuvieron muestras de tejido normal (sangre periférica, dos tubos con EDTA de 6 ml cada uno) del padre, madre y sus dos hermanas.

Además contamos con muestras de tejido primario y sangre total de pacientes con diagnóstico de OSM esporádico procedentes, seis muestras del Hospital Infantil de México, 15 pacientes de España (donados por el Dr. Jaime Maura) y 39 de Brasil (donados por el Dr. Simone Aguilar), que nos da una n=62.

7.4. Extracción de DNA

El DNA de sangre fue extraído a partir de *buffy coats* utilizando el Puregene blood kit (QIAGEN), de acuerdo con el protocolo del fabricante. En el caso de las

muestras de tejido la extracción de DNA se realizó utilizando el DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN).

7.5. Cuantificación y control de calidad

La integridad del DNA se verificó por electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1%. La cuantificación del DNA para determinar la concentración en nanogramos (A260/A280) para cada muestra y la pureza (A260/A230) de las muestras, utilizando espectrofotómetro NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific), para establecer la cantidad necesaria para el ensayo de secuenciación.

7.6. Control de calidad para secuenciación

Las muestras entraron a la Plataforma de muestras biológicas (BSP) del Instituto Broad de MIT/Harvard y se siguieron los siguientes pasos para evaluar la calidad de las muestras:

1. Identificación a través de un código de barras.
2. Cuantificación del DNA utilizando espectrofotómetro Quant-iT™ PicoGreen®, las muestras > 1 ug y 60ng/ul se consideran muestras adecuadas para secuenciación del genoma completo y su integridad se rectifica valorando su calidad en gel; las muestras que presentaron excesiva degradación en gel de agarosa al 1% (aquellas muestras que presentaron barrido en la zona de corrimiento) fueron excluidas.
3. Asignación de una “huella digital” a través de identificar 23 SNP de alta frecuencia, más un ensayo de género de genotipo en cada muestra utilizando la plataforma Sequenom massArray, para lo que se requieren 150ng DNA, de cada muestra.

7.7. Genotipificación Affymetrix SNP 6.0

Se realizó genotipificación a través del arreglo de Affymetrix SNP 6.0, los resultados se utilizaron para establecer la concordancia del genotipo tumoral con el genotipo de la muestra pareada de tejido normal, además de ofrecer datos de suma importancia sobre la calidad de la muestra. A continuación se describe

brevemente el protocolo para procesamiento de muestras para análisis de variantes utilizando el microarreglo SNP 6.0 de Affymetrix.

Se parte de 500 ng de DNA genómico, el cual se divide en dos tubos de reacción de 250 ng de muestra cada uno. El set de dos tubos de DNA se digiere con las enzimas de restricción Sty y Nsp, una por tubo de reacción, para disminuir la complejidad y redundancia genómica. Los fragmentos generados se ligan a un adaptador específico para cada uno de los productos de digestión que reconoce los extremos cohesivos de 4 pb generados luego del tratamiento con las enzimas de restricción.

El adaptador permite que todos los fragmentos sean reconocidos por un primer universal y las muestras se someten a una PCR bajo condiciones específicas que favorecen la amplificación de los fragmentos de 200 a 1,100 pares de bases. Los productos de PCR obtenidos para las dos enzimas, se mezclan y se purifican utilizando perlas magnéticas. El producto obtenido de la purificación se ajusta a un volumen de 45 ul y se fragmenta utilizando una DNAsa. El fragmentado se marca con un residuo terminal unido a biotina y la muestra se hibrida al microarreglo durante 16-18 horas a 50°C ajustando la rotación del horno a 60 rpm. El microarreglo se lava de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante y se tiñe con un conjugado de estreptavidina marcada con fluoresceína. El microarreglo, una vez lavado y teñido, se coloca en el escáner de alta resolución de la plataforma de Affymetrix. Los resultados se analizan utilizando el software Genotyping Console de Affymetrix.

El microarreglo SNP 6.0 está diseñado para detectar 906,600 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y contiene más de 946,000 sondas para la detección de variantes de número de copia; 424,000 SNP incluyen los tag SNP derivados del Proyecto internacional del HapMap y contiene SNP representativos de DNA mitocondrial así como de los cromosomas Y y X.

7.8. Secuenciación de genoma y exoma

Una cantidad de 250ng de DNA de las muestras fue utilizada para la construcción de librerías y fueron secuenciadas con el instrumento Illumina HiSeq 2000 utilizando lecturas de 76-bp paired-end. Los resultados del software de Illumina

fueron procesados con el Picard data-processing pipeline para dar archivos BAM files que contienen lecturas calibradas y alineadas. Todos los procesos se realizaron con instrumentos de manejo de líquidos automatizados y el seguimiento de la información de las muestras fue realizada por un LIMS automatizado.

7.8.1. Construcción de librerías

Las librerías se construyeron utilizando el siguiente protocolo: primero, el ADN genómico inicial se redujo de 3µg a 100ng en 50µL de solución; segundo, para el ligamiento de adaptadores, los adaptadores de Illumina paired end fueron reemplazados con adaptadores palindromic forked con ocho bases únicas index embebidas dentro del adaptador. Estas secuencias index permiten hacer un “pooling” de librerías antes de la secuenciación. Tercero, kits para preparación de muestras de Kapa Biosciences fueron utilizados para todos los pasos enzimáticos en el proceso de construcción de librerías. Se realizó selección de híbridos en solución (para las librerías de exomas) como se describe previamente (29).

7.8.2. Amplificación de clústeres y secuenciación

La amplificación de clústeres y secuenciación de los templados desnaturalizados se realizó de acuerdo al protocolo del fabricante (Illumina) usando el v3 cluster amplification kits, v3 flowcells, v3 Sequencing by Synthesis kits, Multiplexing Sequencing Primer kits, y la última versión de software RTA de Illumina.

7.9. Análisis de exoma

Las lecturas de Pair-end fueron alineadas al genoma de referencia humano hg19/GRCh37 utilizando la herramienta Burrows-Wheeler Aligner (BWA 0.5.9). Los datos de secuencia de exomas fueron generados usando captura de híbridos en solución seguido de secuenciación Illumina. Las lecturas duplicadas de PCR fueron identificadas usando Picard 59. Las alineaciones cerca de sitios indel putativos fueron refinados utilizando GATK, utilizando las muestras de tumor y normales (sangre periférica). El grado de contaminación por otras muestras fue

estimado usando ContEst. Las mutaciones somáticas fueron detectadas utilizando MuTect. Las inserciones y deleciones pequeñas fueron identificadas usando Indelocator. Las mutaciones debido a daño oxidativo del DNA durante la preparación de la librería fueron removidas usando D-ToxoG (<http://www.broadinstitute.org/cancer/cga/dtoxog>). Las mutaciones somáticas fueron detectadas utilizando Oncotator. El ratio total de número de copias calculado como la tasa de la profundidad de lectura de la fracción de tumor por la profundidad de lectura media fraccional en las muestras normales, seguido de segmentación binaria circular. Los perfiles del número de copias fueron analizados usando GISTIC. El análisis del número de copias absoluto, pureza/ploidia y clonalidad fueron realizados con Absolute. Las variantes germinales fueron detectadas utilizando Unified Genotyper en Genome Analysis Toolkit (<http://broadinstitute.org/gatk/>), usando las opciones *default*, después se filtraron los SNP usando Variant Quality Score Recalibration, que permite la identificación de variantes en la secuencia de una muestra con gran especificidad y sensibilidad, y Hard-filtering of indels, que permite determinar los parámetros para filtrar SNP y extraer indels de la lectura. Las variantes germinales fueron anotadas utilizando la herramienta SeattleSeq (<http://snp.gs.washington.edu/SeattleSeqAnnotation>). Las variantes no silenciosas fueron identificadas como aquellas en clases: frameshift, frameshift-near-splice, missense, missense-near-splice, splice-3, splice-5, stop gained, stop-gained-near-splice, stop-lost. Las variantes germinales de novo fueron descubiertas usando xBrowse (<http://atgu.mgh.harvard.edu/xbrowse>). Las variantes germinales fueron definidas como raras si se presentaban en <0.5% del NHLBI Exome Variant Server o EVS. La prueba de Fisher's fue utilizada para determinar si las variantes germinales estaban significativamente asociadas con OSM cuando se comparaban a muestras EVS. Para el análisis integrado de variantes somáticas, se utilizó el algoritmo Mutation Significance (MutSigCV) para identificar mutaciones somáticas significativas utilizando mutaciones somáticas detectadas tanto en SGC (Secuenciación de Genoma completo) como en SEC (Secuenciación de Exoma completo). Los genes identificados por MutSigCV con alta frecuencia de mutación que lo esperado fue evaluado considerando

múltiples covariables entre las que se encuentra la composición de bases del gen, la longitud, tasa de mutación basal y cobertura de secuenciación. Todas las alteraciones del exoma (mutaciones puntuales somáticas, inserciones, deleciones cortas y alteraciones en el número de copias) fueron analizadas usando un algoritmo heurístico PHIAL (algoritmo heurístico para el análisis de mutaciones somáticas clínicamente relevantes), que interpreta el significado clínico y biológico de cada alteración en el exoma. La significancia clínica fue definida como alguna alteración que puede predecir la sensibilidad o resistencia a un tratamiento, o si tiene ramificaciones pronósticas o de diagnóstico. Todas las alteraciones que calificaron como potencialmente accionables clínicamente fueron revisadas manualmente.

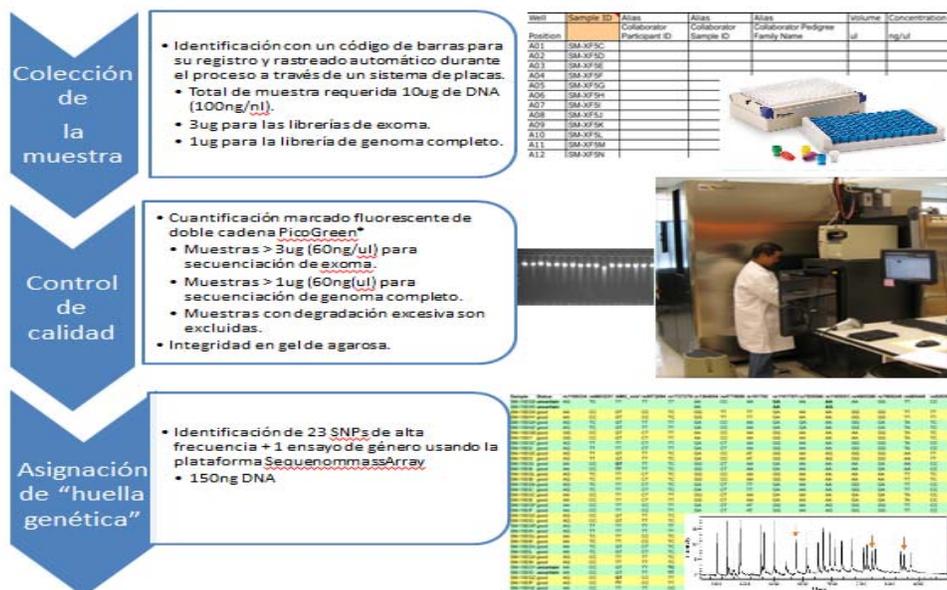


Figura 2. Procesamiento de muestras (Primera parte)

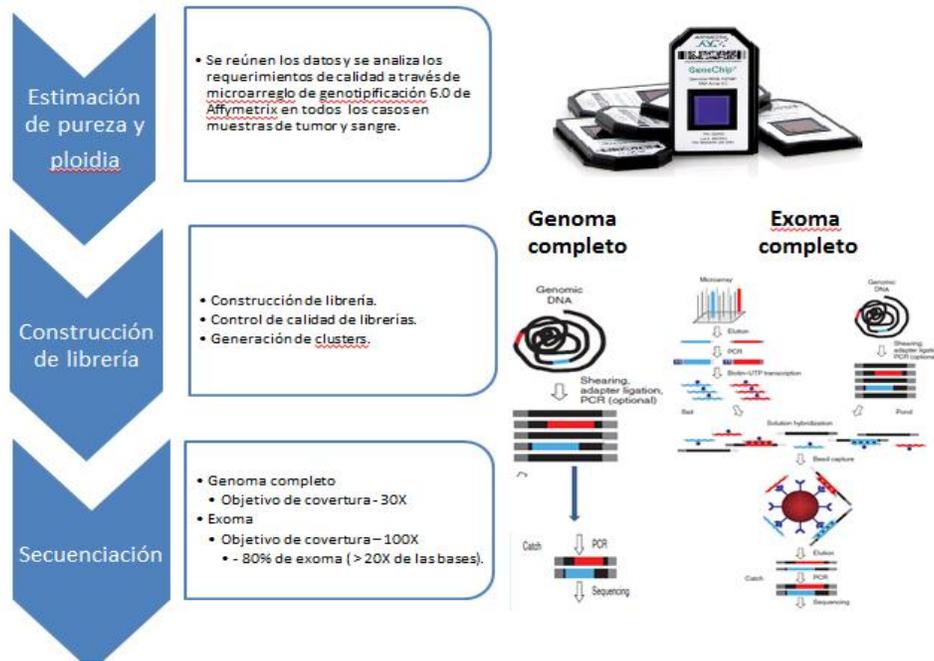


Figura 3. Procesamiento de muestras (Segunda parte)



Figura 4. Procesamiento de datos de secuenciación

7.10 Validación de variantes usando secuenciación Sanger

Para la validación de las mutaciones de p53 identificadas en los hermanos, las regiones genómicas de 500pb alrededor de las mutaciones de interés fueron amplificadas por PCR utilizando para el caso de la mutación p.S127P ubicado en el exón 5 los oligonucleótidos 5'-CTGTTCACTTGTGCCCTGAC-3' y 5'-AACCAGCCCTGTGCTCTCTC-3' y para la mutación p.R273H ubicado en el exón 8, los oligonucleótidos fueron 5' TTCCTTACTGCCTCTTGCTT-3' y 5'-AGGCATAACTGCACCCTTGG-3' (30). Se utilizó secuenciación Sanger (Macrogen) de un total de 18 muestras que corresponden a seis miembros de la familia (muestras de sangre y muestras de tumor de los dos casos de interés), cuatro muestras de pacientes pediátricos con diagnóstico de osteosarcoma esporádico (muestras de sangre y tumor). Se utilizó la herramienta Multiple Sequence Alignment de Clustal Omega (<http://ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para el alineamiento de las secuencias y visualización de la zona de interés. Los electroferogramas fueron inspeccionados manualmente usando Sequencher v5.1 (Gene Codes Corp, MI, USA).

8. Resultados

8.1. Cuantificación y geles de integridad

En las tablas 4 y 5 se presentan los resultados de las cuantificaciones de las muestras de DNA de los probandos y sus familiares, así como 5 muestras de pacientes diagnosticados como osteosarcoma esporádico. El DNA fue cuantificado utilizando NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific) y la integridad del DNA fue evaluada a través de geles de agarosa.

Tabla 4. Cuantificación de las muestras de familia

Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
41-S	195.72	3.914	2.041	1.92	2.38
41-T	3.15	0.063	0.041	1.52	0.18
41-T-2	2.57	0.051	0.004	12.28	0.15
41-T-3	487.17	9.743	5.141	1.9	0.71
42-S	260	5.2	2.763	1.88	2.28
42-T	451.87	9.037	4.702	1.92	0.78
43-S	160.1	3.202	1.688	1.9	2.35
43-S-2	71.07	1.421	0.762	1.87	2.29
44-S	572.71	11.454	6.198	1.85	2.33
44-S-2	76.79	1.536	0.758	2.03	2.29
45-S	60.75	1.215	0.61	1.99	1.98
45-S-2	146.55	2.931	1.543	1.9	2.19
46-S	76.27	1.525	0.77	1.98	1.95
46-S-2	91.62	1.832	0.95	1.93	1.83
46-S-3	75.22	1.504	0.785	1.92	2.17

Tabla 5. Cuantificaciones muestras osteosarcoma esporádico

Sample ID	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
73-S	1099.74	21.995	11.567	1.9	2.16
73-T	72.82	1.456	0.769	1.89	1.45
107-S	1025.74	20.515	10.903	1.88	2
107-T	314.34	6.287	3.12	2.02	1.82
114-S	572.98	11.46	6.21	1.85	2.05
114-T	493.54	9.871	4.873	2.03	1.79
228-S	581.52	11.63	6.487	1.79	1.73
228-T	289.92	5.798	3.098	1.87	1.12
223-S	682.68	13.654	7.548	1.81	1.28
223-T	74.64	1.493	0.803	1.86	0.32

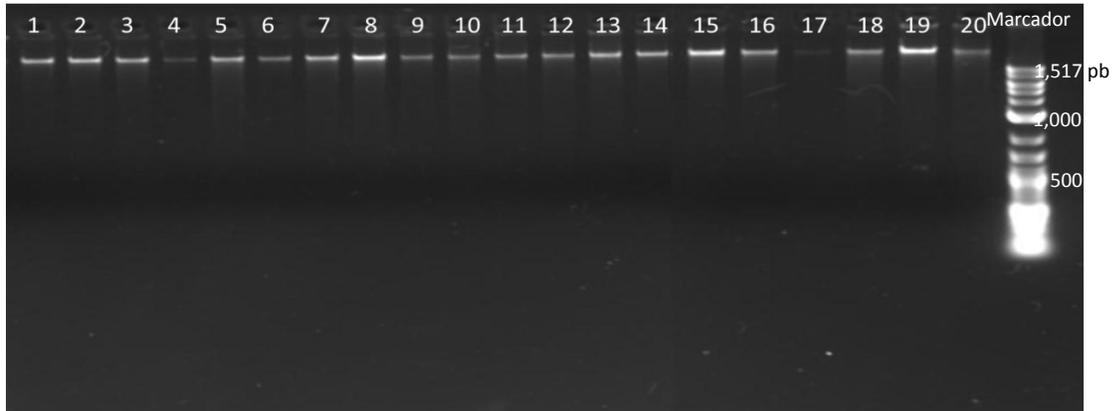


Figura 5. Gel de integridad. Todas las muestras revelan integridad adecuada para su procesamiento.

8.2. Análisis de genotipos (SNP 6.0 Affymetrix)

8.2.1. Genotipos asignados

Con la finalidad de evaluar la calidad de los microarreglos de genotipificación se compararon los genotipos asignados por el SNP 6.0 con genotipos obtenidos de microarreglos del proyecto de tumores sólidos pediátricos del Broad Institute (Cambridge, EEUU). En la figura 6^a observamos en el eje de las X, los pacientes (familia), en el eje de Y, el número de sondas para SNP del microarreglo. En azul rey se observa el número total de sondas utilizadas, en rojo el total de sondas que fueron detectadas, en verde observamos el número genotipos homocigotos que coinciden con el alelo de referencia y después los que no coinciden (ALT), y en morado el número de heterocigotos, en este gráfico el comportamiento esperado es una línea constante para cada color, que no se cumple en el caso de los probandos, donde se observa una desviación en las líneas que corresponden a los homocigotos que no coinciden con el alelo de referencia y los heterocigotos; por lo que se concluyó que la proporción de heterocigotos estaba fuera de lo esperado, principalmente en el caso de las muestras de tumores de los probandos. Esta falta de correlación puede deberse, por una parte, a fallas del microarreglo o por el control poblacional que se utilizó. Por este motivo se

decidió realizar la comparación con un nuevo control poblacional, que incluyó 30 muestras de mestizos-mexicanos, lo cual mejoró notablemente los resultados (Figura 6-B).

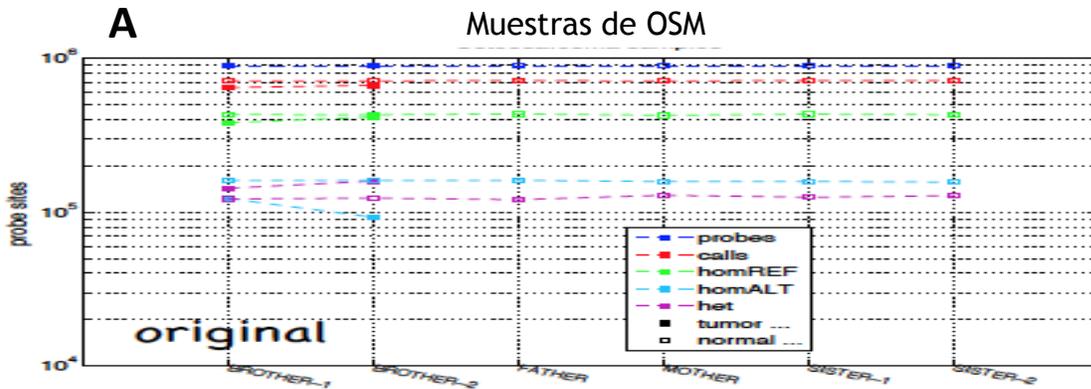


Figura 6. (A) Análisis de Asignación de genotipos

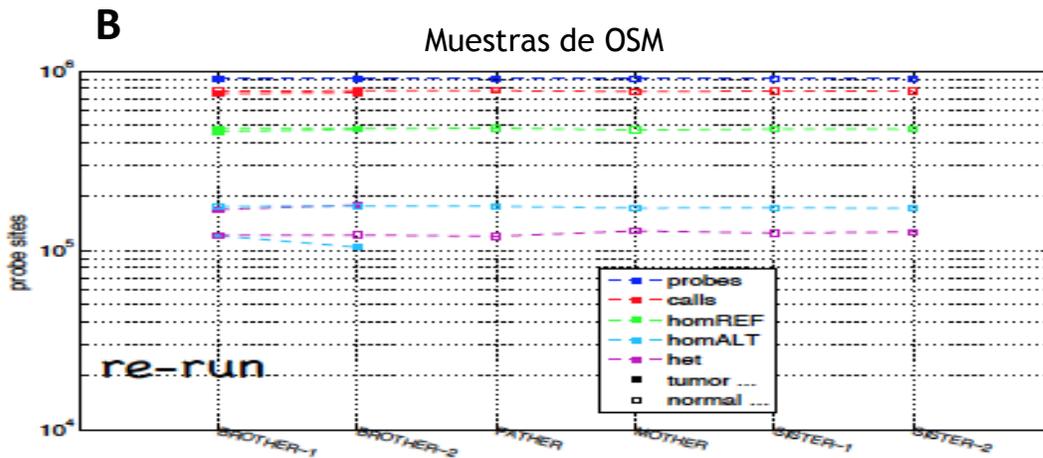


Figura 6. (B) Análisis de asignación de genotipos

8.2.2. Análisis para revisión de errores mendelianos

Un error mendeliano es un error de genotificación donde los hijos tienen un genotipo que no puede ser heredado de los padres de acuerdo a las leyes de Mendel. En este análisis se busca que coincidan en una diagonal, los niveles de heterocigosidad y homocigosidad entre los miembros de la familia que se

consigue a través del conteo de genotipos de los hijos dependiente del conteo alélico de los padres. En un primer análisis el genotipo de los pacientes de interés se determinó utilizando como control poblacional 20 arreglos de muestras del Hapmap Internacional, sin embargo, con este análisis se observó variación de los genotipos homocigotos y heterocigotos que no coinciden con el alelo de referencia (Figura 7-A). Posteriormente se decidió utilizar como control poblacional 30 arreglos del mismo lote generados por el Inmegen y que correspondían a población mestiza mexicana, con lo cual se consiguió la normalización del comportamiento, como se observa en la Figura 7-B.

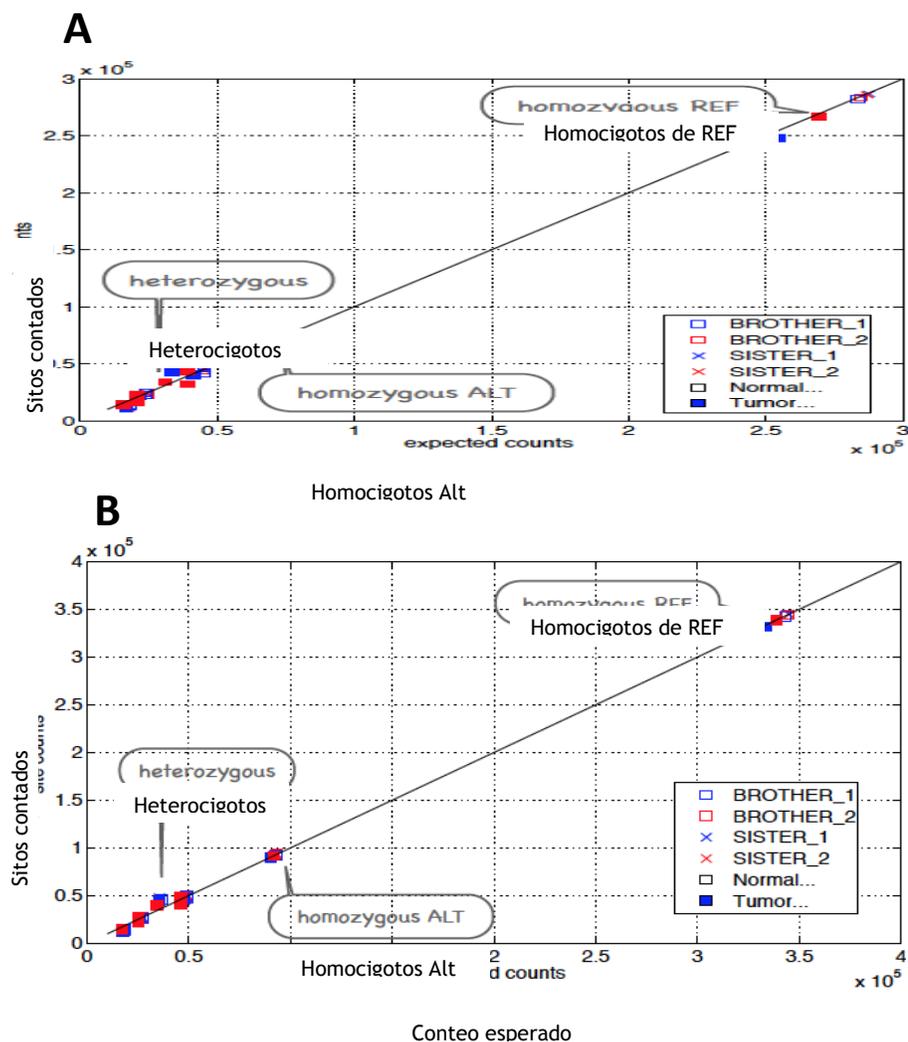


Figura 7. Análisis de errores mendelianos 1

En un segundo análisis para evaluar errores mendelianos se seleccionan sitios en el genoma en donde ambos padres son homocigotos, y por lo tanto también deben serlo los hijos, esperando una correlación 0.99 (IC 95%). En el análisis con los 20 arreglos del HapMap internacional, se identificó que en un caso tenía una correlación de 0.97 (IC 95%), pero después de utilizar los controles poblacionales de mestizos-mexicanos se alcanzó una correlación del 0.99 (IC95%).

A	Familia Homocigotos de REF → Niños (Probandos) Homocigotos de REF					
Muestra	Hermana1	Hermano1-T	Hermano2-Nor	Hermana2-Nor	Hermano1-Nor	Hermano2-T
Conteo	286685	248120	283452	285914	282107	267146
Esperado	287513	254517	284757	287025	283720	269429
Radio	0.997	0.975	0.995	0.996	0.994	0.992

A	Familia Homocigotos ALT → Niños (Probandos) Homocigotos ALT					
Muestra	Hermana1	Hermano1-T	Hermano2-Nor	Hermana2-Nor	Hermano1-Nor	Hermano2-T
Conteo	76602	66424	75818	76358	75311	71438
Esperado	76936	68212	76285	76765	75913	72153
Radio	0.996	0.974	0.994	0.995	0.992	0.990

B	Familia Homocigotos REF → Niños (Probandos) Homocigotos REF					
Muestra	Hermana1	Hermano1-T	Hermano2-Nor	Hermana2-Nor	Hermano1-Nor	Hermano2-T
Conteo	344706	331639	344050	344928	342706	338500
Esperado	344846	333118	344296	345092	343307	338710
Radio	1.000	0.996	0.999	1.000	0.998	0.999

B	Familia Homocigotos de ALT → Niños (Probandos) Homocigotos de ALT					
Muestra	Hermana1	Hermano1-T	Hermano2-Nor	Hermana2-Nor	Hermano1-Nor	Hermano2-T
Conteo	93241	90000	93133	93286	92687	91670
Esperado	93297	90388	93228	93364	92867	91738
Radio	0.999	0.996	0.999	0.999	0.998	0.999

Figura 8. Análisis de errores mendelianos 2

8.2.2. Pureza y ploidía

La pureza y ploidía de las muestras se evalúa a través del algoritmo de Absolut, desarrollado por el Instituto Broad-MIT-Harvard, que permite el cálculo del porcentaje de contaminación con células normales y el grado de aneuploidía de la muestra a partir de la información de variación del número de copias (CNV) obtenida del SNP 6.0 (Affymetrix) y consiste en hacer una comparación con muestras pareadas del mismo paciente, se usó para este caso, una muestra de sangre periférica y una muestra de tumor del mismo individuo. El algoritmo consiste inicialmente en realizar un análisis de cariotipo de los pacientes que se contrasta con la cantidad de mutaciones somáticas puntuales del porcentaje de fracción alélica obtenida, con estos datos se generan posibles interpretaciones del perfil de copias para cada muestra que se comparan con el perfil de número de copias obtenidas, lo que genera varios modelos posibles, se elige entonces el modelo base que será el que presente mayor fracción genómica analizada al sumar los datos obtenidos del cariotipo con el análisis del número de copias somáticas, que coincide con el modelo que presenta mayor porcentaje de pureza y ploidía de la muestra.

En las siguientes imágenes se presentan los modelos que fueron elegidos para cada paciente.

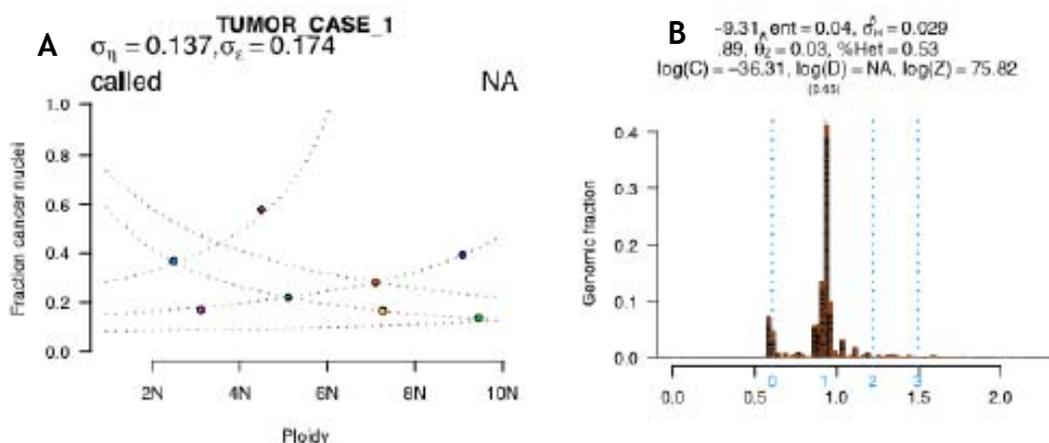


Figura 9. Modelo de pureza y plodia (caso 1)

En la figura 9A se contrastan los diferentes modelos de ploidía obtenidos para este tumor contra los modelos de fracción nuclear correspondientes a cáncer o células tumorales. En este caso se seleccionó el modelo ubicado entre 4N y 6N de ploidía y 0.6 de fracción nuclear de cáncer. En la figura 9B se representa gráficamente este modelo donde se muestra el perfil del número de copias obtenido a partir de la determinación de la concentración relativa local DNA y la fracción alélica que corresponde con una mayor fracción genómica correspondiente a células tumorales.

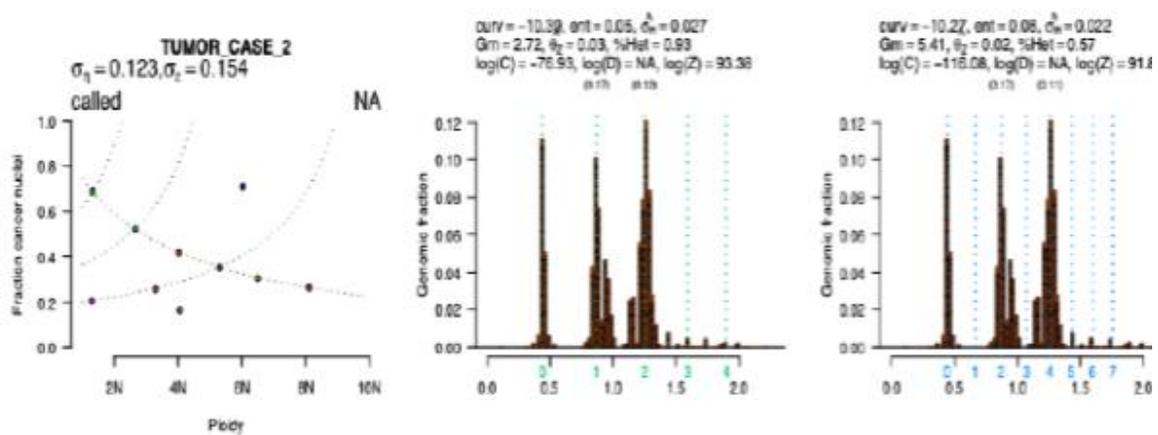


Figura 10. Modelo de pureza y plodía (caso 2)

En el caso 2 tenemos dos modelos que muestran el perfil de este tumor consistente con la presencia de una subclona distinta con los diferentes SCNA. En este caso se obtuvieron dos modelos que mostraban porcentajes adecuados de concentración relativa local de DNA tumoral uno ubicado entre 0N y 2N de ploidía y el segundo ubicado en 6N de ploidía. La figura 10B muestra los gráficos que representan ambos modelos, donde se muestra el perfil del número de copias, obtenido a partir de la determinación de la concentración relativa local DNA y la fracción alélica que corresponde con una mayor fracción genómica correspondiente a células tumorales.

Tabla 6. Análisis Absolut

Muestra	Pureza	Ploidía	Duplicaciones Genómicas	Delta	Cobertura con 80% de poder	Fracción de DNA de cáncer	Fracción de genoma subclonal
T. caso1 (52000000041)	49%	2.68	0	0.21	20	0.56	0.04
T. caso2 (52000000042)	33%	1.87	1	0.17	29	0.32	0

En la tabla 6 se reportan los resultados del análisis con el algoritmo Absolut. En el caso 1 se obtuvo un modelo con una pureza del 49% con una tasa de ploidía del 2.68 a una cobertura del 20%, obteniendo un total de 56% de fracción de DNA de cáncer. En el caso 2 correspondió a un modelo con 33% de pureza y una tasa de 1.87 de ploidía a una cobertura del 29%, con lo que se consiguió un total de 32% de fracción de DNA del tumor o cáncer. Además se puede observar que el caso 2 tuvo un evento de duplicación genómica.

La “cobertura con un poder 80%” es un estimado de la cobertura de secuencia de genoma completo que se necesita para detectar un 80% de mutaciones clonales. Sin embargo, el 80% es una detección pobre, por tal motivo se decidió utilizar una cobertura de 60X que permitiera incrementar la sensibilidad para detectar mutaciones subclonales. La “fracción subclonal del genoma” es una medida de cuánto del genoma del tumor tiene un nivel de número de copias inconsistente tanto con células clonales como con células normales (sólo refleja la fracción del genoma que no es compatible con el modelo del cariotipo de Absolut).

8.3. Cobertura de secuenciación

El estimado de contaminación de las muestras fue <0.5%, la cobertura par a las muestras de tumores fue de 50X y para las muestras de sangre periférica fue de 30X.

Tabla 7. Análisis de cobertura muestras OSM

A (Caso 5200000041)

Cat	Territorio	Pb secuenciadas (tumor)	Pb secuenciadas (normal)	Profundidad (tumor)	Profundidad (normal)	Pb leídas	% de lectura
IGR	1, 929,696,481	97,433,745,275	59,421,958,804	50.5	30.8	1, 613,308,045	83.6
Intrón	883,403,538	52, 791,602,614	32,083,039, 081	59.8	36.3	860,924,550	97.5
UTR	234,744,341	13,895,514,702	8,433,829,680	59.2	35.9	225,484,301	96.1
Exón	32,575,120	2,161,,612,909	1,283,349,427	66.4	39.4	31,718,368	97.4
Total	3,080,419,480	166,282,445,500	101,222,176,992	54.0	32.9	2,731,435,264	88.7

A (Caso 5200000042)

Ca	Territorio	Pb secuenciadas (Tumor)	Pb secuenciadas (Normal)	Profundidad (Tumor)	Profundidad (Normal)	Pb leídas	% de lectura
IGR	1, 929,696,481	97,433,745,275	59,421,958,804	50.5	30.8	1, 613,308,045	83.6
Intrón	883,403,538	52, 791,602,614	32,083,039, 081	59.8	36.3	860,924,550	97.5
UTR	234,744,341	13,895,514,702	8,433,829,680	59.2	35.9	225,484,301	96.1
Exón	32,575,120	2,161,,612,909	1,283,349,427	66.4	39.4	31,718,368	97.4
Total	3,080,419,480	166,282,445,500	101,222,176,992	54.0	32.9	2,731,435,264	88.7

Territorio= Territorio genómico total en ésta categoría. **Pb Secuenciadas=** Número total de pares de bases secuenciadas. **Profundidad=** Profundidad de cobertura. **Pb leídas=** Número total de pares de bases.

8.4. Mutaciones germinales

Para identificar mutaciones germinales que pudieran ser responsables por el fenotipo en la familia, se realizó secuenciación genómica de ambos probandos y secuenciación exómica del padre, madre y hermanas. El análisis para la identificación de SNP e indels se realizó con la herramienta UnifiedGenotyper en GATK, se utilizaron las opciones default y se filtraron los SNP utilizando Variant Quality Score Recalibration y hard-filtering indels. Para la identificación de

variantes raras se utilizó la base de datos del Proyecto de Secuenciación del Exoma del NHLBI (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>). En el caso de variantes de novo se utilizó el algoritmo y código descrito en Neale *et al.* 2012 (31).

Se identificaron 54 variantes con cambio de sentido (missense) en 43 genes, una de estas variantes está presente en <5% de la población, de acuerdo a los datos reportados en ESP5400, se trata de una variante heterocigota en los padres, homocigoto en ambos probandos y no homocigota en las hermanas no afectadas. Otro de los genes mutados candidato fue SLC38A4 p. G29R rs2429467 (COSMIC gene), sin embargo, está presente en aproximadamente el ~4% de la población general por lo tanto es poco probable que se trate de un gen causal de cáncer.

Para la identificación de mutaciones *de novo* no silentes se utilizaron los criterios descritos por Neale *et al.*, los datos crudos se revisaron manualmente usando la herramienta Integrative Genomics Viewer (<http://www.broadinstitute.org/igv>). En el caso 520000000042, ninguna mutación cumplió con los criterios. Para el caso 520000000041 se identificó la variante rs2664522 en NCOA3 (3nt indel), previamente implicado en cáncer y la variante rs79258919 en TCP10, esta variante se presenta en ~6% de la población general, por lo cual se consideró un falso positivo.

8.5. Mutaciones somáticas

8.5.1. Análisis con MuTect

Para el análisis de mutaciones somáticas usamos MuTect, este método desarrollado por el Instituto Broad tiene como propósito principal la identificación de mutaciones somáticas puntuales con alta especificidad en datos de secuenciación de nueva generación (32). El método opera con cada *locus* genómico independiente y consiste en tres pasos clave:

1. Preprocesamiento de las lecturas alineadas en el tumor y normal de los datos de secuenciación. En este paso se hace la remoción de falsos positivos, ignorando aquellas lecturas con demasiados *mismatches* o con un marcador de calidad muy bajo, ya que estos pueden representar

artefactos obtenidos durante la secuenciación o bien aquellas secuencias que son capturadas por error en el modelo.

2. Análisis estadístico que identifica sitios que son probables de tener mutaciones somáticas con alta confianza. El análisis predice una mutación somática utilizando dos clasificadores bayesianos, el primero tiene el objetivo de detectar si el tumor tiene una referencia de un sitio específico y aquellos sitios que se encuentran como de no referencia, el segundo clasificador se asegura de que el perfil alélico del “tejido normal” no tenga la variante. La clasificación se realiza calculando un LOD score (*log odds*) y se compara con el perfil obtenido de un punto de corte determinado por el log ratio de posibilidades previas de los eventos considerados como probables.
3. Posprocesamiento de mutaciones somáticas candidatas para eliminar artefactos de la secuenciación de nueva-generación que consiste en determinar la relevancia del evento identificado en relación con lo reportado en las diferentes bases de datos, finalmente se realiza alineación de secuencias cortas obtenidas y la captura de híbridos.

A continuación se presenta la tabla que describe cada uno de los filtros a los que se somete el alineamiento para determinar las mutaciones presentes en una muestra.

Tabla 8. Filtros para la identificación de mutaciones somáticas

Nombre del filtro	Descripción
Intervalo proximal	Remover falsos positivos causados por errores de alineamiento, como pequeñas inserciones y deleciones. Reejecuta sitios candidato de fue leída ≥ 3 veces con inserciones de 11 pb, centrándose en mutaciones candidato o sitios leídos ≥ 3 veces.
Pobre mapeo	Remover falsos positivos causados por secuencias similares encontradas en el genoma. Usando dos test: A) mutaciones candidatos ubicadas en \geq del 50% de las lecturas y que en alguno de los tejidos la lectura fue = 0. B) Candidatos que no guarda ninguna relación de alelo mutante en un score ≥ 20 en cualquiera de los tejidos.
Sitios trialélicos	Remueve falsos positivos causados por sitios trialélicos donde la muestra de tejidos normal es heterocigoto con alelos A y B y en MuTect es considerado como un alelo alternativo “C”. Además considera si la variante es biológicamente posible

Observaciones en control	Elimina falsos positivos en los datos del tumor observados en los datos del control (normalmente al momento de contrastar con la muestra normal) para probar el alelo alterno más allá de lo esperado de los errores de lectura de secuenciación. Un candidato es reflejado si en el control de los datos, éste aparece en más de dos observaciones del alelo alterno o si representa más del 3% de las lecturas y la suma es igual a más de 20.
Panel de muestras normales	Reflejo de artefactos y variantes de líneas germinales inspeccionando el panel de muestras normales y reejecutando los candidatos que están presentes en dos o más muestras.

8.5.2. Análisis con MutSig (Mutation Significance)

MutSig analiza listas de mutaciones identificadas por secuenciación, para identificar genes que están mutados más frecuentemente que lo esperado, dado un proceso de mutación. La valoración de datos con MutSig nos ayuda a determinar la significancia de las mutaciones encontradas. De los resultados obtenidos en el análisis de nuestros pacientes en conjunto con las muestras de pacientes de OSM esporádico se obtuvieron los siguientes datos.

Tabla 9. Tabla de resultados de MuTec & MutSig

Individuo	n_ silent	n_non silent	N_cov	Silent_rate _per_Mb	Nonsilent_rate _per_Mb	N_dbSNP	dbSNP_rate _per_Mb
Caso 1	24	73	32,396,723	0.74	2.25	14	0.43
Caso 2	11	23	32,360,431	0.34	0.71	9	0.28

De este análisis el total de cobertura para el caso 1 fue de 32,396,723 lecturas y de 32,360,431 lecturas para el paciente menor (5200000000041), lo que se considera una cobertura adecuada, el total de mutaciones silentes identificadas fueron de 24 y 11 respectivamente, el total de mutaciones no silentes son de 73 y 23, a partir de las cuales se determina la tasa de mutación silente por Mb que resultaron en 0.74 y 0.34 y la tasa de mutación no silente por Mb fue de 2.25 y 0.71, al contrastar las variantes identificadas con la base de datos dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism Database) se identificaron 14 y 9 SNP reportados para cada paciente respectivamente, que corresponde a una tasa de 0.43 y 0.28 por Mb para cada paciente. Con los datos anteriores puede establecerse que el

número de mutaciones silentes, no silentes, así como la tasa de mutación por Mb para el caso 2 es de más el doble que para el caso 1.

Finalmente se determinó la significancia de los regiones de interés obtenidas en MuTec, que correspondieron específicamente a mutación de sentido erróneo o mutación sin sentido, que se traduce en el cambio de un nucleótido provocando la aparición de un codón que codifica para un aminoácido diferente. Se identificaron 107 genes con mutaciones significativas de sentido erróneo las cuales se muestran en la Tabla 10. Cuando se compararon los dos hermanos se encontró que dos genes estaban mutados en ambos P53 y MUC 4, las mutaciones identificados en p53 fueron p.S127P (caso 2) y P53 p.R273H en el caso 1. Para MUC4 p.E1033A (caso 2) y p.V1881A en el caso 1. Como se puede observar no se encontró la misma mutación en ambos hermanos. En el caso 2 también se encontró una mutación en el gen RP1B p.Y1303H que al igual que P53 ha sido previamente asociado a la génesis de osteosarcoma.

Tabla 10. Lista de mutaciones no silentes

Símbolo Hugo	Cromosoma	Posición de inicio	Posición terminación	Clasificación de variante	ID Muestra	Cambio Proteína
ABC1	7	87160635	87160635	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.K887T
ACSL6	5	131323830	131323830	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.L223M
ALLC	2	3749980	3749980	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.D335Y
ALOXE3	17	8011875	8011875	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.P532H
ANKRD11	16	89351652	89351652	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.I433R
ANKRD30 A	10	37454067	37454067	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.N627S
ANO8	19	17439771	17439771	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.T476P
APOL1	22	36661965	36661965	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.E361D
ARHGAP3 2	11	128936764	128936764	Inserción en el marco de lectura	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.G164_splice
ARTN	1	44402376	44402376	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.V201G
ATP2C2	16	84497317	84497317	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.Q940H
AUP1	2	74755617	74755617	Inserción en el marco de lectura	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.S232_splice
AVIL	12	58197143	58197143	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.R617S
C16orf88	16	19725705	19725706	Inserción en el	Osteosarcoma-	p.I218fs

				marco de lectura	52000000042-Tumor	
CAD	2	27465205	27465205	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.N2044K
CCDC144B	17	18498059	18498060	Mutación en el sitio de edición	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.E623_splice
CCDC55	17	28506148	28506149	Inserción en el marco de lectura	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.R114fs
CDYL	6	4952584	4952584	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.G527R
COL6A6	3	130300456	130300456	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.G1200E
CPNE4	3	131268822	131268822	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.A424V
CRB1	1	197404697	197404697	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.G1235A
CTBS	1	85035783	85035783	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.R119I
CUL9	6	43167817	43167817	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.D1103N
DAXX	6	33289063	33289063	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.H163Q
DDX11	12	31236747	31236747	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.G49W
DNAH9	17	11660930	11660930	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.E2306K
DNAH9	17	11726242	11726242	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.E3046A
DOCK5	8	25216495	25216495	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.C956F
DYNC1H1	14	102498701	102498701	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.L3326M
EGFLAM	5	38451508	38451508	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.P887S
FAM47C	X	37026727	37026727	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.S82P
FER1L6	8	125115440	125115440	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.A1727S
FGD1	X	54482175	54482175	Delección en el marco de lectura	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.L629fs
FHL3	1	38463655	38463655	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.R161S
GH1	17	61994670	61994670	Mutación en códon de paro	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.*218W
GRB14	2	165365287	165365288	Inserción en el marco de lectura	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.K297fs
GSTA5	6	52697787	52697787	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.V139A
GZMA	5	54405901	54405901	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.S227Y
HECTD2	10	93272042	93272042	Nonsense	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.C744*
HLA-B	6	31323262	31323262	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.R243W
HSPA5	9	128000869	128000869	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.G412C
ICAM5	19	10403713	10403713	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.W419L
IL18R1	2	102984477	102984477	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.E84G
JAK1	1	65332805	65332805	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.K245R
KHSRP	19	6418069	6418069	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.D301N
KIFC2	8	145698633	145698633	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.R773C
KLHL31	6	53519637	53519637	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.S145F

KLRK1	12	10530737	10530737	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.P176H
KRIT1	7	91870319	91870319	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.Q84K
LDB2	4	16900033	16900034	Deleción en el marco de lectura	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.M25fs
LGSN	6	63990902	63990902	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.R185K
LRP10	14	23345296	23345296	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.R380H
LRP1B	2	141643764	141643764	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.Y1303H
LRP5	11	68174248	68174248	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.N686K
LRRC37B	17	30351758	30351758	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.L570I
MARCO	2	119729092	119729092	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.G148C
MARS2	2	198571282	198571282	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.D385N
MCHR1	22	41077354	41077354	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.L231M
METT11D1	14	21458425	21458425	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.D38N
MUC4	3	195512809	195512809	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.V1881A
MUC4	3	195515353	195515353	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.E1033A
MYCN	2	16086204	16086204	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.H460Q
MYO15A	17	18047268	18047268	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.D2044G
NAP1L3	X	92926847	92926847	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.G486V
NBPF10	1	145293511	145293511	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.R36G
NDRG2	14	21486164	21486164	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.L311M
NGDN	14	23944426	23944426	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.L64R
OBSL1	2	220419255	220419255	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.S1606*
OR4N4	15	22382935	22382935	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.H155Y
PCLO	7	82585122	82585122	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.G1716V
PDF	16	69363038	69363038	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.W207G
POLRMT	19	621504	621504	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.P732T
PPP6C	9	127933373	127933373	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.I54M
PRB2	12	11546320	11546322	Deleción en el marco de lectura	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.N230del
PRB4	12	11461444	11461444	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.H158P
PRDM9	5	23527052	23527052	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.R619W

PRKCA	17	64683301	64683301	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.I201T
PSG1	19	43376001	43376001	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.K209N
RANBP2	2	109370348	109370348	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.K708R
REPIN1	7	150069439	150069439	Deleción en el marco de lectura	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.A370fs
RNF128	X	106016255	106016255	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.H199Q
RNF139	8	125498270	125498270	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.W127L
RYR3	15	33835834	33835834	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.G220C
SCAND3	6	28543053	28543053	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.E477K
SCN2A	2	166237619	166237619	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.I1488T
SDR42E1	16	82033633	82033633	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.Q89E
SEL1L3	4	25849372	25849372	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.V93I
SETD1A	16	30990916	30990916	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.A1270V
SLC12A4	16	67981280	67981280	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.A676T
SLC25A28	10	101380085	101380085	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.L3W
SLC39A1	1	153932882	153932882	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.V223F
SRPX	X	38079976	38079978	Deleción en el marco de lectura	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.L23del
SYN2	3	12046124	12046126	Deleción en el marco de lectura	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.P40del
TEX10	9	103109031	103109031	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.Q280K
TMEM214	2	27260042	27260042	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.P336T
TMPRSS4	11	117975521	117975521	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.Q142H
TP53	17	7577120	7577120	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000041-Tumor	p.R273H
TP53	17	7578551	7578551	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.S127P
TRIO	5	14485179	14485179	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-52000000042-Tumor	p.V2220G

TRPM4	19	49699764	49699764	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-520000000042-Tumor	p.G760W
TTN	2	179426090	179426090	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-520000000041-Tumor	p.G25689R
TUT1	11	62343120	62343120	Mutación no sinónima	Osteosarcoma-520000000042-Tumor	p.E729*
URB2	1	229771525	229771525	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-520000000041-Tumor	p.F389L
ZBTB49	4	4322834	4322834	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-520000000041-Tumor	p.T697P
ZCCHC11	1	52940959	52940959	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-520000000042-Tumor	p.A758S
ZCCHC7	9	37357162	37357162	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-520000000042-Tumor	p.P510H
ZER1	9	131503864	131503864	Mutación no sinónima	Osteosarcoma-520000000042-Tumor	p.E563*
ZNF208	19	22155980	22155980	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-520000000042-Tumor	p.S519I
ZNF286B	17	18565431	18565431	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-520000000042-Tumor	p.G463E
ZNF286B	17	18565529	18565529	Mutación sin sentido	Osteosarcoma-520000000042-Tumor	p.Q430H
ZNF775	7	150094073	150094073	Mutación no sinónima	Osteosarcoma-520000000042-Tumor	p.C168*

8.6 Perfil de variación en el número de copias.

En las siguientes imágenes se pueden apreciar los perfiles de variación en el número de copias (CNV), donde pueden identificarse las variaciones estructurales cromosómicas para cada miembro de la familia.

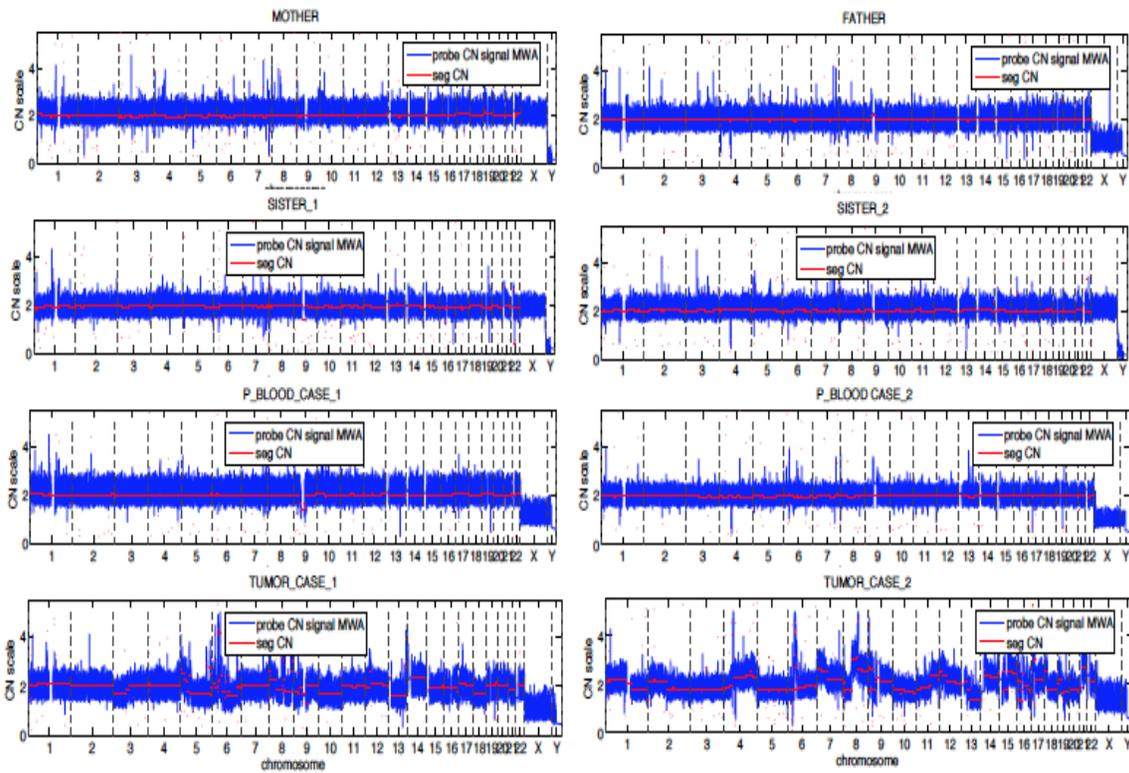


Figura 11. Perfil de CNV de la familia

Al comparar los perfiles es evidente la severa alteración en los casos índice. En el caso 1 (041) que corresponde al paciente menor, las variaciones más importantes para este caso se encuentran en la regiones cromosómicas 6p y 8p, que consisten en amplificaciones, a continuación se presenta la imagen del caso en particular, que permite visualizar mejor este dato.

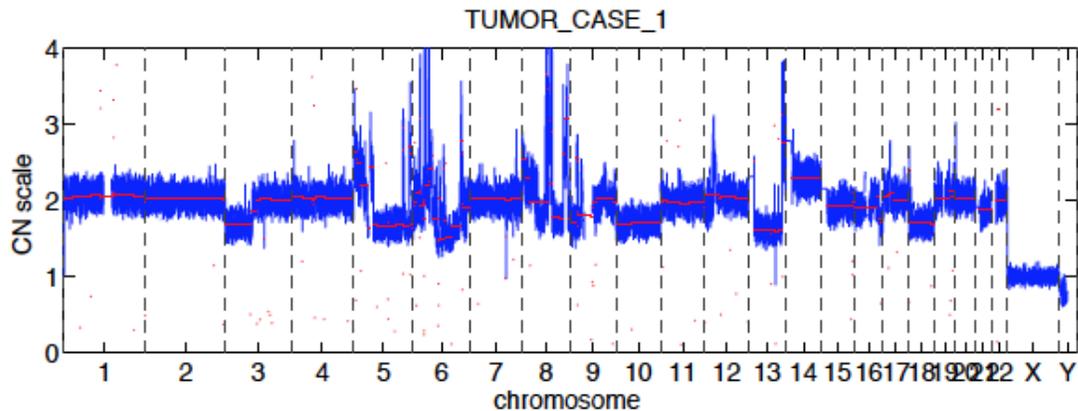


Figura 12. Perfil de CNV del paciente menor (041)

Para el caso 042, el paciente mayor, se observa mayor variación en el perfil, aunque de igual forma pueden apreciarse importantes amplificaciones en las regiones cromosómicas 6p, 8p. Atendiendo al resto de las variaciones también resultan evidentes las amplificaciones ubicadas en los cromosomas 15p, 16p y 17p.

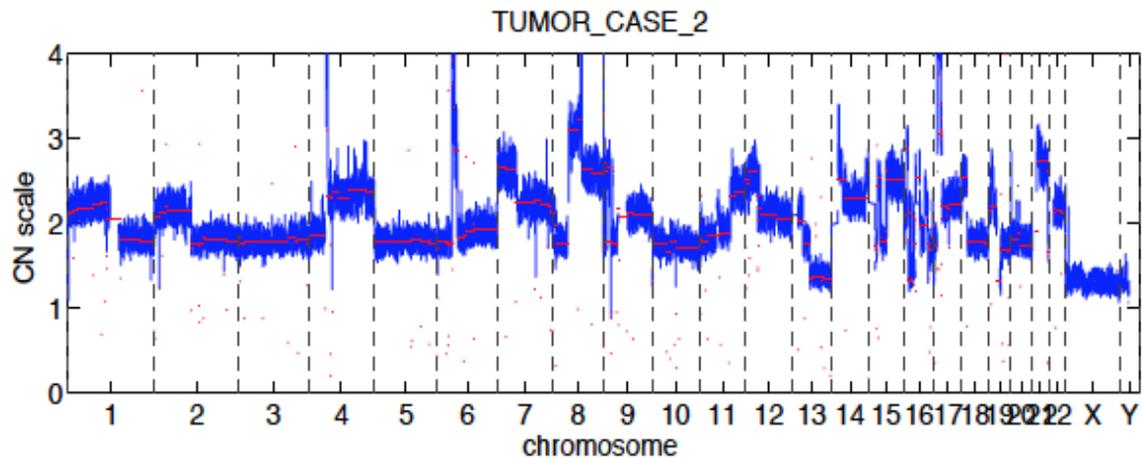
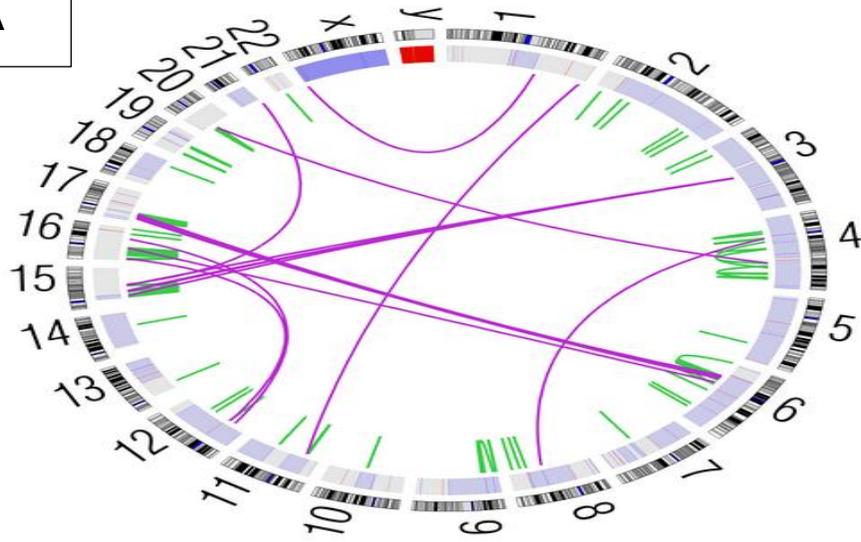


Figura 13. Perfil de CNV del paciente mayor (042)

8.7. Rearreglos cromosómicos

El análisis de rearrreglos cromosómicos se realizó con dRanger, herramienta para identificar reordenamientos somáticos; como grupos de lecturas de secuenciación de pares de terminación aberrantes en un tumor en donde la muestra normal tiene lecturas pareadas consistentes con la referencia. Los puntos de ruptura candidato del dRanger se pasan hacia un “punteador de las zonas de ruptura”, el cual aplica el algoritmo Smith-Waterman modificado para todas las lecturas en la región e identificar el soporte de las lecturas divididas del rearrreglo.

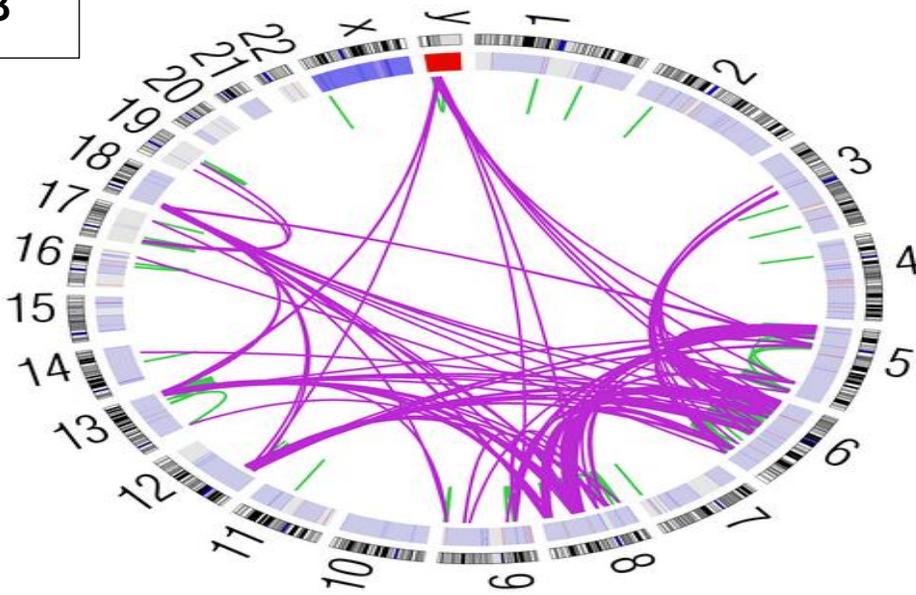
A



Caso 1

Figura 14. Gráfico de circo. Rearreglos cromosómicos

B



Caso 2

Figura 14. Gráfico de circo. Rearreglos cromosómicos

En el caso de paciente mayor se obtuvieron los siguientes datos: Se identificaron un total de 418 rearrreglos de los cuales 187 correspondieron a rearrreglos intercromosomales, 161 rearrreglos mayores de 1Mb, 49 que se encontraban en un rango entre 10kb-1Mb y 21 rearrreglos locales menores de 10Kb. Para el paciente menor (5200000000041) se identificaron un total de 41 rearrreglos intercromosómicos, 62 rearrreglos mayores de 1Mb, 36 rearrreglos de entre 10kb-1Mb y 22 rearrreglos de menos de 10Kb. De lo que se puede concluir que el paciente mayor presentó mayor cantidad de rearrreglos intercromosómicos y mayor cantidad de rearrreglos mayores de 1Mb comparado con el paciente menor (5200000000041).

Tabla 11. Análisis DRanger rearrreglos cromosómicos

Rearreglos	Caso 1	Caso 2
Intercromosomal	41	187
Rango mayor de (1Mb+)	62	161
Rango medio (10Kb-1Mb)	36	49
Local (<10Kb)	22	21
Total	161	418

En cuanto a la cantidad de rearrreglos de rango medio entre 10kb-1Mb y los rearrreglos locales menores a 10Kb, las cantidades son muy similares entre ambos pacientes como se puede observar en el resumen del gráfico de circo que se presenta en la tabla 11. Sin embargo, nuevamente ninguno de estos rearrreglos se encontró de igual forma entre ambos hermanos, descartando la posibilidad de un mecanismo de mutación hereditaria.

8.7 Identificación de patógenos

En estudios previos se ha sugerido que una causa del desarrollo de OSM podría ser un agente infeccioso, la secuenciación de nueva generación usando lecturas “paired end” permite la detección de patógenos en tejidos de cáncer con alta eficiencia y precisión. Para la identificación de secuencias de patógenos se examina la secuencia de lecturas que no pudieron ser ubicadas en el genoma del paciente. “PatSeq” es una herramienta computacional para la identificación y análisis de secuencias microbianas en alto conteo en una secuencia humana, los datos son diseñados para trabajar un gran número de secuencias de lectura a gran escala. Este proceso está compuesto de una fase de sustracción en la cual el input de lecturas son sustraídas por alineamiento de una secuencia humana de referencia y una fase analítica en la cual el resto de las lecturas son alineadas a secuencias de referencia microbiana de virus, bacterias y arqueobacterias para ser ensambladas de nuevo.

De las secuencias identificadas para el paciente mayor se ubicaron Torque teno virus recientemente clasificado dentro de la familia de los *circuviridae* reportado en pacientes con miopatía severa inflamatoria idiopática, cáncer y lupus registrando alta carga viral aunque aún no se conocen consecuencias críticas (33); también se identificó Lausanevirus, virus DNA que infecta algas y amibas. En el caso del paciente menor (5200000000041) presentó secuencias de herpes virus humano 6b comúnmente infecta humanos y se ha relacionado con roséola infantil y herpes virus humano 7 de la familia *herpesviridae*, aunque no se han reportado infecciones comunes por este virus; Iridovirus, responsable de la enfermedad hemorrágica grave y alta mortalidad en los cultivos de salamandras gigantes chinas (34). Mixomavirus causante de mixomatosis, enfermedad letal en conejos europeos, finalmente se identificó la secuencia de algunos segmentos cortos de enterovirus RNAmc de sentido positivo asociado con diversas enfermedades en humanos y con mamíferos, específicamente asociado con enfermedades del tracto respiratorio (35). Sin embargo, los datos obtenidos indican que ninguno de los virus se presentó en ambos hermanos, lo cual nos sugiere que no fue la causa de presentación simultánea de OSM en ambos hermanos.

Tabla 12. Patógenos identificados por PathSeq

CASO_1 (52000000041)		CASO_2 (52000000042)	
Patógenos identificados		Patógenos identificados	
Normal	Tumor	Normal	Tumor
HHV7	HHV7	Retrovirus rojo endógeno humano	Virus mosaico
HHV6b	Iridovirus	Torque Teno Virus	Coronavirus
	Mixomavirus		Lausannevirus

8.8 Validación para TP53

De acuerdo con los resultados obtenidos de la secuenciación sanger, se obtuvieron un total de 18 secuencias correspondientes al exón 5, el output de 13 se alinearon al genoma de referencia (Fig. 13) con los siguientes parámetros; número de iteraciones 1, guía máxima de tres iteraciones -1, máximo de iteraciones HMM (Modelo ocultos de Markov) 2 y tipo de secuencia DNA. De las secuencias analizadas para la región de interés todas muestras de osteosarcoma esporádico presentan la secuencia normal para el aminoácido serina (TCC), en el caso de la familia, el padre, madre y hermana menor presentan la secuencia TAG que corresponde con una transversión relativamente frecuente en este gen de C:A en el segundo nucleótido del aminoácido y una transición de C:G el tercer nucleótido del aminoácido, que se traduce como codón de paro y se confirma la transición T:C en paciente mayor que codifica para el aminoácido prolina (CCC).

```

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

140721-23_E03_42T-E5_P53-EXON5.ab1 -----
140721-23_M01_41T-E5_P53-EXON5.ab1 -----
140721-23_M09_228T-E5_P53-EXON5.ab1 -----GGACGTGTGTTAGCTCTTGCCTGCTCTACTAGACTGAAGTGGACTGCGTGT
140721-23_I03_43S-E5_P53-EXON5.ab1 -----GGCATCGTITGCTCTATGAGACCTATGAGAGACGACACATGGACGTGCGTGTG
140721-23_A05_45S-E5_P53-EXON5.ab1 -----AAAATAGATAGGGCTCTACTACGATGCTAGCCGACGACACGTCAACTAGGAT
140721-23_A03_42S-E5_P53-EXON5.ab1 GGGGGTCACGATACATCAGTCTACTGTACAGCCCCGAGACCCGATCAGACAACGTAGTG
140721-23_I01_41S-E5_P53-EXON5.ab1 -----GGACATAGATCGCTAAGAGTTGATTGACTAGACGACCAGGGTGGGTA
140721-23_M03_44S-E5_P53-EXON5.ab1 -----GGAGCGGTTAATAGTGAATCTGCATACAGTACTAGACATGCTTTGCGATTAGGA
140721-23_E09_223T-E5_P53-EXON5.ab1 -----GGACAGTGGGACTGCTATTTCTACAGTACTCCCCTACCGTCAACAAGAT
140721-23_E05_46S-E5_P53-EXON5.ab1 -----GGGGGGGAAGCTCCATTACTGTCTATAATACTAGCCCAACCTCAACAAGAT
140721-23_I09_228S-E5_P53-EXON5.ab1 -----GCCGTACTCATCTATCGTCGTGCATTACTCCCCGCCCTCAACAAGAT
140721-23_A09_223S-E5_P53-EXON5.ab1 -----AACGGTACTCCCTCTTTATACAGTACTCCCCGCCCTCAACAAGAT
140721-23_M07_114T-E5_P53-EXON5.ab1 -----AACGTGTTCACTTCATTCTACAGTACTCCCCGCCCTCAACAAGAT
140721-23_A07_107S-E5_P53-EXON5.ab1 -----GCGTGTCTCTCTCTTCTACAGTACTCCCCGCCCTCAACAAGAT
140721-23_I05_73S-E5_P53-EXON5.ab1 -----GGGCCGTAGTACTCTAATCGTCTGCGTTACTACCAGCCCTCAACAAGA
140721-23_I07_114S-E5_P53-EXON5.ab1 -----ACGTACTCATCTCTTCTACAGTACTCCCCAGCCCTCAACAAGA
140721-23_E07_107T-E5_P53-EXON5.ab1 -----GAACCGTGTCTCAATCACTCTGTCAGTACTCCCCAGCCCTCAACAAGA
TP53 -----TACTCCCAGCCCTCAACAAGA
140721-23_M05_73T-E5_P53-EXON5.ab1 -----GCACCCGTTCTGATCTCTTCTACAGTACTCCCCAGCCCTCAACAAGA
    
```

Figura 15. Aliamiento de secuencias Exón 5

Para el Exón 8 se obtuvieron 17 secuencias adecuadas para análisis, el output de 15 se alinearon al genoma de referencia (Fig. 14) con los siguientes parámetros; número de iteraciones 1, guía máxima de tres iteraciones -1, máximo de iteraciones HMM (Modelo ocultos de Markov) 1 y tipo de secuencia DNA. De las secuencias analizadas para la región de interés (CGT) que codifica para el aminoácido arginina, una muestra (073S) que corresponde a un paciente con OSM esporádico presentó una transversión T:G (CGG) que codifica para el mismo aminoácido arginina; la muestra de tumor 114T presenta una transición (GCT) que codifica para el aminoácido alanina. La muestra de la hermana menor se observa la siguiente secuencia, AGG que también codifica para el aminoácido arginina, el primer y tercer aminácidos del codón presentan una transversión C:A y T:G respectivamente, tratandose así de una mutación silenciosa.

```

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

140721-23_009_228T-E8_P53-EXON8.ab1      -----ATTGGCTACGCAGAAGCTGCTAIGGGTGCAGTTTGCCTTGGGAATTGCGCGT
140721-23_003_44S-E8_P53-EXON8.ab1      -----ACTTCCGAAGTCATGAGCTGCCAGGGTGCAGTTATGCCTTGTCTGAGGGGGT
140721-23_G03_42T-E8_P53-EXON8.ab1      -----
140721-23_C03_42S-E8_P53-EXON8.ab1      -----
140721-23_007_114T-E8_P53-EXON8.ab1      GCTTGCCTCCGACTATATACTAGGATATTCTGGCTGCTGTCAAAATTTGTTTGCCTGTT

140721-23_009_228T-E8_P53-EXON8.ab1      -----CCGCATCTGACTGATCGTATCTACTGGGACGGAACAGTATTTGAGGTGCGTGTT
140721-23_C07_107S-E8_P53-EXON8.ab1      -----AGCCATCTGACTGATGGTATCTACTGGGACGGAACAGCAITTTGAGGTGCGTGTT
140721-23_C09_223S-E8_P53-EXON8.ab1      --GCGGCTTTCTGCAGTGTGCGTATCTACTGGGACGGAACAGTATTTGAGGTGCGTGTT
140721-23_K09_228S-E8_P53-EXON8.ab1      ----CCCACTCTGCAGTATGGTATCTACTGGGACGGAACAGCAITTTGAGGTGCGTGTT
140721-23_C05_45S-E8_P53-EXON8.ab1      --CGGGCTACTGCATGAGCTGCTATGGGTGCAGTTATAGCCATTTGTTGAGGTGCGTGTT
140721-23_K01_41S-E8_P53-EXON8.ab1      GTAGACAATGGATGCGTGCTGATATACGTGCAACTTATAGAGACTTTGAGGTGCGTGTT
140721-23_G09_223T-E8_P53-EXON8.ab1      --GGGCATCTGGAGGTGGGCTGATCATAGTTGCAACGGTAGACTTTTGAAGGTGCGTGTT
140721-23_G07_107T-E8_P53-EXON8.ab1      ----GGGCCTCTCAGTGCAGCGGCTCATACTGGGACGGAAGAGTTTTGAGGTGCGTGTT
TP53                                       -----TGTAATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTT
140721-23_005_73T-E8_P53-EXON8.ab1      -----CGGCCTCTGCAGTGTGGTATCTACTGGGACGGAACAGCTTTGAGGTGCGTGTT

```

Figura 16. Alineamiento de secuencias Exón 8

8.9 Exposición ambiental

De acuerdo con los resultados del análisis de secuenciación, no se identificaron mutaciones germinales, sin embargo sí se identificaron en cada uno de los hermanos una mutación somática missense, independiente, potencialmente

funcional en TP53. Los modelos animales han mostrado que la mutación de TP53 en el tejido indicado y en el tiempo indicado es suficiente para dar origen a OSM. Estas mutaciones somáticas pueden surgir como resultado de la acción química de agentes endógenos o exógenos.

Como se comentó en los antecedentes, el único factor ambiental establecido como factor de riesgo para OSM es la exposición a radiación ionizante de tratamientos previos con radioterapia. De acuerdo con los antecedentes, sabemos que ninguno de los casos índice tuvo exposición previa con radiación ionizante.

Sin embargo, algunos estudios han sugerido que existen otros factores ambientales posibles como es la exposición a fluoruro y pesticidas. Para descartar esta posibilidad se realizó una indagatoria para estudiar las condiciones medioambientales en las que se desarrollaron ambos probandos antes del diagnóstico de OSM. Para la identificación de factores relacionados con el desarrollo y ocupacionales parentales, se diseñó un cuestionario que fue aplicado a la familia, donde se cuestionó a la madre y padre sobre las condiciones durante el periodo gestacional, neonatal y de la infancia de ambos pacientes.

En cuanto a la exposición parental de acuerdo al tipo de trabajo, como la industria manufacturera, granjas agrícolas y en jardinería, no se encontró exposición en ninguno de los padres. Se cuestionó a los padres sobre sus hábitos en la vida cotidiana, sobre sus ocupaciones, así como las condiciones en las que laboran, para indagar sobre los riesgos ambientales a los que pudieran estar expuestos y con los que se podría asociar el desarrollo de OSM en ambos casos. La madre ha sido ama de casa y el padre trabaja en restaurantes, por lo cual se descartó este factor de riesgo.

La familia radica en la ciudad de Los Reyes, Michoacán, territorio que cuenta con una superficie de 408.09 km² que representa el 0.81% de la superficie del estado. La principal actividad económica en la zona es la agricultura, esta actividad se ha mantenido desde hace cuatro siglos y en la actualidad el cultivo de la caña de azúcar es la principal producción agronómica del lugar.

año por uso de pesticidas que son utilizados de manera indiscriminada, para el control de plagas en los cultivos.

9. Discusión

La secuenciación de nueva generación resulta una herramienta útil para la identificación de todas las alteraciones genéticas presentes en un genoma, por lo cual resulta atractiva como un medio para el estudio de cáncer. Esta herramienta podría ayudar en el manejo de clínico de pacientes al identificar mutaciones germinales, así como al diagnóstico de síndromes de cáncer hereditario para poder ofrecer asesoramiento genético apropiado a las familias. En el presente estudio se utilizó secuenciación de nueva generación para el estudio exhaustivo del genoma de una familia en donde dos hermanos fueron diagnosticados simultáneamente con OSM, esperando identificar mutaciones germinales y confirmar el diagnóstico de cáncer hereditario.

Para descartar esta posibilidad se analizó el genoma de células germinales de los casos índice y sus familiares. En particular se buscaron todas aquellas mutaciones asociadas a OSM en la literatura incluyendo TP53 (Li-Fraumeni), RB1 (retinoblastoma hereditario), WRN (síndrome de Werner), REQ4 (Rothmund Thomson II y síndrome Rapadilino), BLM (síndrome de Bloom), PS19, RPL5, RPL11, RPL35A, RPS24, RPS17, RPS7, RPS10, RPS26 (Anemia de Diamond Blackfan) y ninguna de ellas fueron identificadas en ninguno de los miembros de la familia. Mutaciones *de novo* ubicadas en TP53 pueden encontrarse hasta en un 3% de los pacientes sin historia sugestiva de síndrome Li-Fraumeni (1), sin embargo, tampoco se identificaron en DNA germinal de los casos índice.

La búsqueda de mutaciones germinales no reportadas previamente en OSM identificó en los probandos una variante heterocigota en los padres, homocigota en ambos probandos y no homocigota en las hermanas no afectadas, sin embargo, esta variante está presente en el ~4% de la población general, se trata de *SLC38A4* pG29R rs2429467, una variante con cambio de sentido (missense). Su

alta frecuencia en la población la hace poco probable como causante del fenotipo.

Otra de las posibilidades es la presencia de mutaciones *de novo*, las cuales fueron analizadas de acuerdo a los criterios descritos por Neale y cols. (31). No se encontró ninguna mutación *de novo* que compartieran ambos hermanos y que cumpliera los criterios, sólo en el caso 520000000041 se identificó la variante idSNP rs2664522 en el gen *NCOA3* exon_20, previamente implicado en cáncer de mama (18).

En el análisis de perfil de CNV de los casos índice, pudieron observarse cambios importantes en las regiones cromosómicas 6p y 8p en el caso 041 y las regiones cromosómicas 6p, 8p, 15p, 16p, 17p en el caso 042. Lo anterior coincide con los perfiles reportados en la literatura, particularmente en el estudio de Smida y cols., donde se reportan alteraciones en 10 pacientes una N=45 pacientes con diagnóstico de OSM en la región cromosómica 6p, en el mismo estudio se identificaron siete pacientes con amplificaciones en 8q, 12q amplificado en cinco casos (14). Aunque el estudio de Chen y cols. presenta datos similares sin embargo en este estudio se consideran otras zonas de alta variación, un total de 10,806 alteraciones no específicas a detalle, pero a partir de estos datos se profundiza en las alteraciones ubicadas en *TP53* por ejemplo (37).

El perfil de rearrreglos cromosómicos que incluye datos de LOH, rearrreglos intracromosómicos, intercromosómicos, pérdidas y ganancias cromosómicas, permitieron identificar un total de 187 rearrreglos intercromosómicos en el paciente mayor y 41 en el paciente menor. De los rearrreglos que corresponde a un rango mayor de 1 Mb se identificaron un total de 161 rearrreglos en el caso del paciente mayor y 62 en el paciente menor; que tal y como lo describe Chen y cols. existe una diferencia entre la cantidad de rearrreglos, entre pacientes con metástasis donde se presenta una mayor cantidad de rearrreglos y aquellos pacientes sin metástasis, que presentan menor cantidad de rearrreglos (37). Sin embargo, ninguna de estas alteraciones cromosómicas fue recurrente, por lo cual también se descartaron.

De las mutaciones somáticas se identificaron algunas variaciones significativas que son compartidas por ambos pacientes; en el caso del paciente mayor (042), mutaciones en TP53 p.S127P (c.379T>C), RP1B p.Y1303H y MUC4 p.E1033A, en el caso del paciente menor (041) correspondieron a TP53 p.R273H (c.818 G>A) y MUC p.V1881A. De las mutaciones puntuales en p53 que se han reportado en cáncer, las transiciones G:C-A:T se presentan con mayor frecuencia, representando hasta el 42.6% de acuerdo a lo reportado en Cosmic, donde ubicamos la mutación puntual (p.R273H) del caso del paciente menor (5200000000041) y las transiciones A:T-G:C que representan el 10.7%, donde ubicamos la mutación puntual del paciente mayor (5200000000042), la mutación p.S127P, esta última reportada en cáncer medular de mama (38). La mutación p.R273H ha sido reportada en diferentes tipos de cáncer representando el 3.1% en una N=25,902.

El factor de transcripción p53 es un supresor de tumores, el cual es activado cuando se reconoce daño induciendo quiescencia celular, senescencia, o apoptosis. TP53 interactúa con otros genes para inducir diferentes funciones celulares; el incrementando en la proliferación celular se asocia con su interacción con MYC, CXCL1, PCNA, CCNE2, CCNA2, CCNB1, CCNB2, ASNS, IGF1R, EGFR; la inhibición de apoptosis con EGR1, NFKB2, TIMM50, LGALS3, BCL2L1; con los que lleva a cabo actividades metabólicas como ACAT2, HMGCS1, HMGCR, MVK, IDI1, FDPS, FDFT1, SQLE, LSS, CYP51A1, TM73F2, SC4MOL, NSDHL, DHCR7, DHCR24; en cuanto a actividades de señalización célula-célula y de matriz extracelular-célula interactúa directamente con PXN; como regulador de actividad GTPasa con ARHGD1A, RANGAP1, DEPDC1, WDR67; en el citoesqueleto con KIF20A, EPB41L4B; en fase de mitosis con BUB1, en el centrómero con NCAPH, MIS18A y CENPA; en el procesamiento de RNAm con CPSF6 y como estabilizador de RNA con ID4 (39).

Estudios en animales han demostrado la asociación tanto de p53 como de Rb1 en la osteosarcomagénesis. El primer estudio en murinos que demostró esta asociación mostró que los ratones transgénicos con expresión del antígeno SV40 large T tenían una alta incidencia de osteosarcomas (40),(41). SV40 inhibe a

miembros de la vías de RB1 y TP53. Modelos murinos con inactivación genética condicional de RB1 y TP53 demostraron que son suficientes para inducir osteosarcomagénesis. Los resultados de estos modelos concluyeron que el silenciamiento de TP53 es necesario y suficiente, por el contrario la inhibición de RB1 es un evento cooperativo pero no suficiente en la osteosarcomagenesis (42), (43).

Los estudios antes descritos de osteosarcomagenesis nos sugieren que las mutaciones somáticas independientes en TP53 identificadas en ambos hermanos pudieran ser el evento causal. TP53 está frecuentemente mutado en diversos tipos de cáncer (38-50%), esto ha permitido tener información suficiente para poder hacer asociaciones entre exposiciones ambientales específicas, mutaciones en TP53 y tipos de cáncer. El gen TP53 puede ser utilizado como indicador de exposición e identificar el carcinógeno responsable de la mutación. Existen cuatro ejemplos de asociaciones entre un agente y mutaciones específicas en TP53, exposición a luz solar y repeticiones en tandem de CC a TT en cáncer de piel no melanoma (44), tabaquismo y transversiones inducidas PAH G a T (45), (46), exposición a aflatoxina B1 y transversiones G a T en el codón 249 (AGG to AGT) en tumores portadores de HBV (47). Por último transversión A a T con cultivos contaminados con semillas de *Aristolochia* sp (48).

El interrogatorio a la familia y la revisión de factores ambientales asociados a osteosarcomagénesis reveló la posible exposición de la familia a pesticidas, basado en la cercanía del domicilio a fábricas de fertilizantes y pesticidas. Hasta el momento la asociación entre pesticidas y osteosarcoma no ha sido corroborada, existen algunos estudios reportados, Hum y cols. realizaron un estudio de casos-controles en Ontario, Canadá, donde se encontró que si el padre se dedicaba a la agricultura, el riesgo de OSM se elevaba (OR 2.1 (IC 95%) (49). En otro estudio realizado en Noruega se reportó que los niños en que ambos padres eran agricultores el riesgo relativo de OSM fue de 2.90 (IC 95%) (9).

Existen algunos reportes de niveles elevados de flúor en el agua en el estado de Michoacán. La exposición crónica a fluoruro también se ha asociado como factor etiológico de osteosarcomagénesis, sin embargo, esta asociación ha

sido controversial. Esta asociación se ha basado en que el fluoruro se colecta en las placas de crecimiento, el fluoruro causaría proliferación excesiva de las células localizadas en estas regiones. Ramesh y cols. publicaron en el 2001, en 20 muestras de OSM, que los niveles altos de fluoruro en las lesiones se correlacionaba con la presencia de mutaciones en p53 (50). Las revisiones realizadas hasta el momento acerca del tema comentan que no existe evidencia de la relación de fluoruro y cáncer. Dos estudios recientes comparando las tasas de OSM entre áreas con altos niveles de fluorinación vs áreas de bajos niveles de fluorinación en Irlanda y EU, no encontraron incremento en el riesgo de OSM. Otro grupo de investigadores midieron la concentración de fluoruro en muestras de hueso normal adyacente al tumor de pacientes con diagnóstico de OSM. El análisis no encontró diferencias significativas en los niveles de fluoruro entre los casos y los controles con otros tumores malignos de hueso (7).

Aunque MUC fue otro de los genes en el que los ambos casos índice presentaron mutación; resulta importante aclarar que en el marco de los grandes proyectos internacionales que ha generado un catálogo importante de genes que han podido implicarse como iniciadores de cáncer y su progresión, al respecto Lawrence y cols. se dieron a la tarea de identificar aquellos genes cuya implicación resultaría inverosímil y lejos a permitir el entendimiento de la entidad ensombresen los eventos de los verdaderos genes “driver”, tratándose así de falsos positivos. La lista generada en este estudio incluye una serie de genes que codifican receptores olfatorios, que se caracterizan por ser genes que codifican para proteínas extremadamente grandes que incluyen a más de 50 de los 83 genes que codifican proteínas con >4,000 aminoácido. Esto incluye a dos grandes proteínas, la proteína muscular titina (36,800 aminoácidos) y la mucinas asociadas a membrana (MUC) 16 y 4 (51).

Es importante enfatizar que sólo pocos estudios de secuenciación de nueva generación con un tamaño muestral tan pequeño han logrado identificar la mutación causal. La mayoría de estos estudios involucran enfermedades mendelianas. Por otra parte, en el caso de los miembros de la familia de los probandos sólo se realizó secuenciación de exoma, y existe la posibilidad de que

la mutación causal pueda localizarse en regiones no codificantes. La identificación de variantes en regiones no codificantes es difícil, ya que se necesitan miles de muestras para poder identificar variantes raras con alta significancia en estas regiones.

Aunque se conoce que la inhibición de TP53 es necesaria y suficiente, como en otros tipos de cáncer, osteosarcoma es el resultado del efecto de un grupo de genes con baja penetrancia, modulado por factores externos, que dan como resultado el riesgo individual (52). Estas variantes pueden participar en diferentes vías, como es el metabolismo de carcinógenos, así como la interacción gen-ambiente. Estudios previos han demostrado que los niños tienen una vulnerabilidad particular a diferentes carcinógenos ambientales debido a dos factores, por un lado exposición diferencial a carcinógenos y por otra parte inmadurez fisiológica, así como la alta división celular y crecimiento que caracterizan esta época de la vida (53). Por lo tanto, las exposiciones in utero y posnatales pueden ser determinantes de diferentes tipos de cáncer pediátrico (54). Los niños pueden estar expuestos a diferentes agentes tóxicos en diferentes maneras: (i) antes de la concepción, a través de la exposición de las células germinales de sus padres (ii) durante el embarazo, por sustancias transmitidas al feto por la madre y (iii) después del nacimiento, en su ambiente diario (52).

Al hablar de ciertos factores, como exposición a fluoruros, pesticidas, herbicidas, para establecer un papel directo en la etiología del osteosarcoma, debido a que muchos estudios están basados en un pequeño número o en un número insuficiente que tenga poder estadístico (>80%) para detectar los pequeños riesgos relativos, o bien debido a que en la mayoría de los estudios se examinan un gran número de factores de riesgo que no permiten observar de manera puntual las aparentes asociaciones (55). Particularmente en OSM en relación con el lugar de residencia en granjas y la ocupación parental como factor de riesgo aún falta explicar el mecanismo exacto a través del cual sucede, así como la relación de estos eventos con la incidencia de este tumor en los dos picos de edad, adolescentes y adultos jóvenes, descritos por diferentes grupos de estudios (10).

En este momento todavía existen importantes limitaciones para poder integrar la información genética en el manejo clínico de los pacientes. Las propuestas que hacen algunos autores son llevar a cabo la identificación de mutaciones de la línea germinal que predisponen a ciertos tipos de cáncer permitiendo apoyar a enfermos o portadores individuales sanos y, en segundo lugar, realizar la caracterización de todas las mutaciones somáticas adquiridas a partir de células tumorales, como puerta a un tratamiento personalizado enfocándose en oncogenes conductores directamente implicados que orienten en la progresión del tumor y su correlación con datos clínicos (56).

Samuel y cols. sugieren como uso clínico inmediato la oportunidad del desarrollo de un registro de mutaciones genómicas en un orden que facilite y mejore su investigación, como la predisposición a cáncer. Y aunque las dificultades frente a una adecuada interpretación clínica de los datos de secuenciación de genealogías son parecidos a los cambios relevantes detectados en mutaciones somáticas en las bases de heterogeneidad intratumoral, la genética y epigenética de los eventos postcigóticos han permitido la identificación por ejemplo de la hipermetilación somática de H19 en niños con tumor de Wilms bilateral y mutaciones en TP53 que ocurren probablemente durante la embriogénesis temprana de los pacientes con síndrome de Li-Fraumeni. Clínicamente, la mayoría de síndromes de cáncer hereditario están asociados con tumores sólidos, un efecto benéfico en la supervivencia es por su detección en estadios tempranos; en tumores sólidos el estadio está relacionado con el pronóstico y el subsecuente manejo se relaciona con la habilidad para detectar la enfermedad en estadios tempranos quirúrgicamente resecables. Entonces la fusión de la secuenciación de nueva generación y las estrategias de vigilancia del cáncer crean un paradigma de la precisión predictiva de la genética del cáncer explorando las innumerables oportunidades que emergen de análisis genéticos de alta tecnología, acompañamiento ético y ensayos técnicos que pueden conducir después a adoptar una terapia personalizada (57).

10. Conclusiones

Sin duda el uso de tecnología de secuenciación de nueva generación ofrece una amplia visualización del genoma de un individuo, partiendo del universo de datos generados y el establecimiento desde este universo, lo que se encuentra relacionado con un fenotipo específico, permitiendo establecer por ejemplo un perfil genómico de mutaciones; aún falta ahondar sobre el entendimiento de lo que representa en la evolución y características de entidades como el cáncer, es decir, la traducción a la clínica de estos acontecimientos genéticos que particularmente en entidades tan complejas como el OSM resultarían de gran ayuda.

De acuerdo al análisis de datos genéticos obtenidos de la familia y especialmente de los casos índice a nivel germinal, se identificó en la familia la variante SLC38A4 pG29R, que no representa una probable causa del fenotipo debido a su alta frecuencia; en el perfil de variantes de la familia se identificó *de novo* NCOA3 rs2664522, que ya antes ha sido implicada en cáncer de mama, aunque tampoco representa una posible causa de OSM por sí misma; sin embargo, en relación con el perfil de rearrreglos cromosómicos, los gráficos permiten visualizar que ninguna de las mutaciones es recurrente para ambos, además de importantes diferencias entre las mutaciones identificadas, hablando tanto del tipo de mutaciones, como de la cantidad de mutaciones en cada uno de los casos índice, hallazgos que permiten sugerir una relación entre el perfil de rearrreglos cromosómicos con la evolución clínica de cada caso.

Partiendo entonces del análisis de mutaciones somáticas, donde se identificó una alteración independiente para cada paciente en p53 y debido al potencial conocido de este gen para generar osteosarcomagénesis, sugerimos estos eventos somáticos como causales, reconocemos entonces estos eventos como mutaciones cuya etiología de acuerdo a los perfiles genéticos de la familia donde no se observó ninguna relación, la posibilidad de que estas alteraciones se hayan dado en relación con un acontecimiento ambiental, que de acuerdo a lo reportado en la literatura se trataría de un caso de desarrollo de OSM relacionado con el factor de riesgo “residencia cercana a zonas de producción

agrícola y “exposición a desechos de fábricas productoras de fertilizantes”; sin embargo, la validación de este dato requeriría primero de información más puntual sobre la forma, tiempo, cantidad y tipo específico de sustancias a las que estuvieron expuestos los casos índice y la familia en su totalidad y cuáles de estas sustancias ya han sido sugeridas como factor de riesgo ambiental para el desarrollo de OSM, en segundo lugar existiría la necesidad de establecer la razón de la presencia de mutaciones somáticas identificadas en estos pacientes y por las cuales se lleva a cabo el desarrollo de la entidad en dos miembros de la familia y a su vez la razón genética por la cual en el resto de la familia no se desarrolla OSM, de manera que se demuestre la evidencia genética que represente un fenotipo relacionado con la exposición ambiental a pesticidas y el posterior desarrollo de OSM y por otro lado permita esclarecer la particularidad en el perfil de variaciones y mutaciones genéticas del resto de la familia que evitaron que el resto de la familia desarrollará la entidad.

11. Perspectivas a futuro

La secuenciación de DNA nos ha permitido aprender sobre la estructura del genoma del cáncer y nos ha conducido al descubrimiento de nuevos genes que ahora identificamos como conductores y de mantenimiento en los procesos de tumorigénesis, la visualización del genoma, el exoma y el transcriptoma que permite la secuenciación masiva a conducido al descubrimiento de las señales de transducción, metabolismo, modificaciones epigenéticas, mantenimiento del ciclo celular y la estructura genómica han conducido al hallazgo de rearrreglos funcionales en la célula que sin duda son datos útiles para el desarrollo de nuevas y potenciales terapéuticas y aplicaciones diagnósticas.

Con base en investigaciones recientes las aplicaciones de la secuenciación de nueva generación y el conocimiento sobre métodos de diagnóstico molecular y sus usos, este tipo de secuenciación tiene futuro, usando ésta para la detección de mutaciones y polimorfismos, medición de la variación en el número de copias y otras variaciones estructurales como son inserciones, deleciones y rearrreglos, análisis epigenéticos de metilación de DNA y remodelado de cromatina.

Probablemente las varias aplicaciones de la tecnología de NSG eventualmente suplanten el rango de técnicas clásicas usadas por laboratorios clínicos para el diagnóstico de cáncer y de muchas otras enfermedades no neoplásicas.

Uno de los mayores retos que se está presentando y enfrentará la medicina genómica es poder modelar correctamente el riesgo, incluyendo tanto factores genéticos como ambientales, ya que sabemos que ninguna de las enfermedades complejas puede explicarse de manera exclusiva a través de factores ambientales o sólo a través de eventos genéticos, por lo que se vuelve indispensable que se expliquen la incidencia, respuesta a tratamiento o progresión de estas enfermedades a través del conjunto de datos expresados a partir de los distintos factores que podrían ser considerados como el factor etiológico para el desarrollo de una entidad específica.

Liu y cols. en una revisión acerca del tema concluyen que: “Los diseños epidemiológicos rigurosos, deben mejorar el análisis que se hace sobre eventos de exposición ambiental, avanzar en el conocimiento de la tecnología genómica y expandir las herramientas de análisis computacionales para estudios ómicos y datos ambientales, así como las implicaciones en políticas de salud y éticas” (58).

Por lo tanto, también en el caso de cáncer pediátrico es importante plantearse estudios que evalúen estas interacciones entre gen-ambiente, para establecer factores de riesgo y medidas de prevención, a través del diseño de estudios epidemiológicos y genómicos multiinstitucionales.

12. Bibliografía

1. Martin JW, Squire JA, Zielenska M. The genetics of osteosarcoma. *Sarcoma*. 2012;2012:627254.
2. Savage SA, Mirabello L. Using epidemiology and genomics to understand osteosarcoma etiology. *Sarcoma*. 2011;2011:548151.
3. Cuevas-Urióstegui ML, Villasis-Keever MA, Fajardo-Gutiérrez A. The epidemiology of cancer in adolescents. *salud pública de méxico*. 2003;45:s115-s23.
4. Marina N, Gebhardt M, Teot L, Gorlick R. Biology and therapeutic advances for pediatric osteosarcoma. *The oncologist*. 2004;9(4):422-41.
5. Fletcher CDM. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone.
6. Ferris ITJ, Berbel Tornero O, Ortega Garcia JA, Claudio-Morales L, Garcia ICJ, Marti Perales V, et al. [Risk factors for pediatric malignant bone tumors]. *Anales de pediatria (Barcelona, Spain : 2003)*. 2005;63(6):537-47.
7. Kim FM, Hayes C, Williams PL, Whitford GM, Joshipura KJ, Hoover RN, et al. An assessment of bone fluoride and osteosarcoma. *Journal of dental research*. 2011;90(10):1171-6.
8. Blakey K, Feltbower RG, Parslow RC, James PW, Gomez Pozo B, Stiller C, et al. Is fluoride a risk factor for bone cancer? Small area analysis of osteosarcoma and Ewing sarcoma diagnosed among 0-49-year-olds in Great Britain, 1980-2005. *International journal of epidemiology*. 2014;43(1):224-34.
9. Kristensen P, Andersen A, Irgens LM, Bye AS, Sundheim L. Cancer in offspring of parents engaged in agricultural activities in Norway: incidence and risk factors in the farm environment. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1996;65(1):39-50.
10. Merletti F, Richiardi L, Bertoni F, Ahrens W, Buemi A, Costa-Santos C, et al. Occupational factors and risk of adult bone sarcomas: a multicentric case-control study in Europe. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2006;118(3):721-7.

11. Operskalski EA, Preston-Martin S, Henderson BE, Visscher BR. A case-control study of osteosarcoma in young persons. *American journal of epidemiology*. 1987;126(1):118-26.
12. Schwartzbaum JA, George SL, Pratt CB, Davis B. An exploratory study of environmental and medical factors potentially related to childhood cancer. *Medical and pediatric oncology*. 1991;19(2):115-21.
13. Yamagata S, Yamagata T. FBJ virus-induced osteosarcoma contains type I, type I trimer, type III as well as type V collagens. *Journal of biochemistry*. 1984;96(1):17-26.
14. Smida J, Baumhoer D, Rosemann M, Walch A, Bielack S, Poremba C, et al. Genomic alterations and allelic imbalances are strong prognostic predictors in osteosarcoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(16):4256-67.
15. Himelstein BP. Osteosarcoma and other bone cancers. *Current opinion in oncology*. 1998;10(4):326-33.
16. Broadhead ML, Clark JC, Myers DE, Dass CR, Choong PF. The molecular pathogenesis of osteosarcoma: a review. *Sarcoma*. 2011;2011:959248.
17. Squire JA, Pei J, Marrano P, Beheshti B, Bayani J, Lim G, et al. High-resolution mapping of amplifications and deletions in pediatric osteosarcoma by use of CGH analysis of cDNA microarrays. *Genes, chromosomes & cancer*. 2003;38(3):215-25.
18. Yang J, Yang D, Sun Y, Sun B, Wang G, Trent JC, et al. Genetic amplification of the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway genes, including VEGFA, in human osteosarcoma. *Cancer*. 2011;117(21):4925-38.
19. Strausberg RL, Simpson AJ, Wooster R. Sequence-based cancer genomics: progress, lessons and opportunities. *Nature reviews Genetics*. 2003;4(6):409-18.
20. Stein LD. The case for cloud computing in genome informatics. *Genome biology*. 2010;11(5):207.
21. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458(7239):719-24.

22. Haimovich AD. Methods, challenges, and promise of next-generation sequencing in cancer biology. *The Yale journal of biology and medicine*. 2011;84(4):439-46.
23. Shyr D, Liu Q. Next generation sequencing in cancer research and clinical application. *Biological procedures online*. 2013;15(1):4.
24. Meldrum C, Doyle MA, Tothill RW. Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective. *The Clinical biochemist Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*. 2011;32(4):177-95.
25. Ku CS, Cooper DN, Iacopetta B, Roukos DH. Integrating next-generation sequencing into the diagnostic testing of inherited cancer predisposition. *Clinical genetics*. 2013;83(1):2-6.
26. Schrader KA, Heravi-Moussavi A, Waters PJ, Senz J, Whelan J, Ha G, et al. Using next-generation sequencing for the diagnosis of rare disorders: a family with retinitis pigmentosa and skeletal abnormalities. *The Journal of pathology*. 2011;225(1):12-8.
27. Link DC, Schuettpelz LG, Shen D, Wang J, Walter MJ, Kulkarni S, et al. Identification of a novel TP53 cancer susceptibility mutation through whole-genome sequencing of a patient with therapy-related AML. *Jama*. 2011;305(15):1568-76.
28. Garber JE, Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(2):276-92.
29. Fisher S, Barry A, Abreu J, Minie B, Nolan J, Delorey TM, et al. A scalable, fully automated process for construction of sequence-ready human exome targeted capture libraries. *Genome biology*. 2011;12(1):R1.
30. Wen WH, Reles A, Runnebaum IB, Sullivan-Halley J, Bernstein L, Jones LA, et al. p53 mutations and expression in ovarian cancers: correlation with overall survival. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*. 1999;18(1):29-41.

31. Neale BM, Kou Y, Liu L, Ma'ayan A, Samocha KE, Sabo A, et al. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature*. 2012;485(7397):242-5.
32. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nature biotechnology*. 2013;31(3):213-9.
33. Hino S, Miyata H. Torque teno virus (TTV): current status. *Reviews in medical virology*. 2007;17(1):45-57.
34. Meng Y, Zhang H, Liang H, Zeng L, Xiao H, Xie C. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of iridovirus in the Chinese giant salamander. *Journal of virological methods*. 2013;194(1-2):211-6.
35. Osterback R, Tevaluoto T, Ylinen T, Peltola V, Susi P, Hyypia T, et al. Simultaneous detection and differentiation of human rhino- and enteroviruses in clinical specimens by real-time PCR with locked nucleic Acid probes. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(12):3960-7.
36. Mure K, Uddin AN, Lopez LC, Styblo M, Rossman TG. Arsenite induces delayed mutagenesis and transformation in human osteosarcoma cells at extremely low concentrations. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2003;41(5):322-31.
37. Chen X, Bahrami A, Pappo A, Easton J, Dalton J, Hedlund E, et al. Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma. *Cell reports*. 2014;7(1):104-12.
38. de Cremoux P, Salomon AV, Liva S, Dendale R, Bouchind'homme B, Martin E, et al. p53 mutation as a genetic trait of typical medullary breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(7):641-3.
39. Freed-Pastor WA, Prives C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes & development*. 2012;26(12):1268-86.
40. Wilkie TM, Schmidt RA, Baetscher M, Messing A. Smooth muscle and bone neoplasms in transgenic mice expressing SV40 T antigen. *Oncogene*. 1994;9(10):2889-95.

41. Knowles BB, McCarrick J, Fox N, Solter D, Damjanov I. Osteosarcomas in transgenic mice expressing an alpha-amylase-SV40 T-antigen hybrid gene. *The American journal of pathology*. 1990;137(2):259-62.
42. Walkley CR, Qudsi R, Sankaran VG, Perry JA, Gostissa M, Roth SI, et al. Conditional mouse osteosarcoma, dependent on p53 loss and potentiated by loss of Rb, mimics the human disease. *Genes & development*. 2008;22(12):1662-76.
43. Berman SD, Calo E, Landman AS, Danielian PS, Miller ES, West JC, et al. Metastatic osteosarcoma induced by inactivation of Rb and p53 in the osteoblast lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(33):11851-6.
44. Giglia-Mari G, Sarasin A. TP53 mutations in human skin cancers. *Human mutation*. 2003;21(3):217-28.
45. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*. 2002;21(48):7435-51.
46. Pfeifer R. Childhood cancer--a mother's story. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2003;39(17):2427-9.
47. Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene*. 2007;26(15):2166-76.
48. Moriya M, Slade N, Brdar B, Medverec Z, Tomic K, Jelakovic B, et al. TP53 Mutational signature for aristolochic acid: an environmental carcinogen. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2011;129(6):1532-6.
49. Hum L, Kreiger N, Finkelstein MM. The relationship between parental occupation and bone cancer risk in offspring. *International journal of epidemiology*. 1998;27(5):766-71.
50. Ramesh N, Vuayaraghavan AS, Desai BS, Natarajan M, Murthy PB, Pillai KS. Low levels of p53 mutations in Indian patients with osteosarcoma and the correlation with fluoride levels in bone. *Journal of environmental*

- pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer. 2001;20(3):237-43.
51. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499(7457):214-8.
 52. Sinnett D, Labuda D, Krajcinovic M. Challenges identifying genetic determinants of pediatric cancers--the childhood leukemia experience. *Familial cancer*. 2006;5(1):35-47.
 53. Perera FP. Environment and cancer: who are susceptible? *Science (New York, NY)*. 1997;278(5340):1068-73.
 54. Whyatt RM, Perera FP. Application of biologic markers to studies of environmental risks in children and the developing fetus. *Environmental health perspectives*. 1995;103 Suppl 6:105-10.
 55. Eyre R, Feltbower RG, James PW, Blakey K, Mubwandarikwa E, Forman D, et al. The epidemiology of bone cancer in 0 - 39 year olds in northern England, 1981 - 2002. *BMC cancer*. 2010;10:357.
 56. Michielin O, Coukos G. [Genomics medicine and oncology]. *Praxis*. 2014;103(10):591-6.
 57. Samuel N, Villani A, Fernandez CV, Malkin D. Management of familial cancer: sequencing, surveillance and society. *Nature reviews Clinical oncology*. 2014;11(12):723-31.
 58. Liu CY, Maity A, Lin X, Wright RO, Christiani DC. Design and analysis issues in gene and environment studies. *Environmental health : a global access science source*. 2012;11:93.