



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN, LGII
GENÉTICA

**Análisis de Perfiles de Expresión de MicroRNAs en Pacientes con Diagnóstico de
Osteosarcoma**

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
LUCERO MARÍA JOSE MONTERDE CRUZ

TUTOR: DR. ALBERTO HIDALGO BRAVO
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN, LGII

Comité Tutor. DR. ANTONIO MIRANDA DUARTE
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN, LGII

DRA. VERONICA MORAN BARROSO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO, FEDERICO GÓMEZ

Ciudad Universitaria. Cd. Mx.

Febrero 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dra. Margarita Valdés Flores

Responsable de la entidad académica

Instituto Nacional de Rehabilitación

Luis Guillermo Ibarra Ibarra

Dr. Alberto Hidalgo Bravo

Tutor

Investigador en Ciencias Médicas

Instituto Nacional de Rehabilitación

Luis Guillermo Ibarra Ibarra

Contenido

Agradecimientos	1
Resumen	2
Introducción	4
Epidemiología.....	4
Fisiopatología	5
Cuadro clínico.....	6
Diagnóstico.....	7
Tratamiento.....	13
Mortalidad vs. Supervivencia	13
MicroRNAs.....	15
Planteamiento del problema	23
Pregunta de investigación	24
Justificación	25
Hipótesis	26
Objetivos	27
Metodología	28
Criterios de selección	29
Descripción de variables	31
Descripción de los procedimientos	32
Toma de muestras de sangre periférica.....	32
Extracción de RNA	32
Perfiles de microRNAs.....	33
Validación de microRNAs por RT-qPCR.....	40
Estadística.....	40
Predicción de blancos y análisis de enriquecimiento de los genes.....	41
Resultados	42
Datos clínicos.....	42
Análisis de expresión de miRNAs	44
Validación de los miRNAs mediante RT-qPCR.....	45
Análisis de enriquecimiento	46
Discusión	49
Conclusiones	54

Expectativas	55
Referencias	56
Anexos	66
Tabla suplementaria 1	67
Tabla suplementaria 2	69
Recursos materiales	76
Aspectos éticos y de bioseguridad	76
Carta de Consentimiento Informado (Pacientes mayores de 18 años)	77
Carta de Consentimiento Informado (Pacientes menores de 18 años).....	81
Carta de Consentimiento Informado (Controles mayores de 18 años)	85
Carta de Consentimiento Informado (Controles menores de 18 años).....	89

Agradecimientos

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo. Y por supuesto, a mi familia; mi madre, mi padre y mi hermano, por su amor, apoyo incondicional, comprensión, paciencia y el ánimo recibido especialmente durante esta época de mi vida.

A Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado como becaria durante la realización de mis estudios de maestría en el programa de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A todos ellos, muchas gracias.

Análisis de Perfiles de Expresión de microRNAs en Pacientes con Diagnóstico de Osteosarcoma

Resumen

Introducción: El Osteosarcoma (OS) es el tumor maligno más frecuente de hueso. Afecta principalmente a personas jóvenes. Con el tratamiento quirúrgico y quimioterapia la supervivencia a 5 años es de 70% en enfermedad libre de metástasis. Sin embargo, la supervivencia en caso de metástasis o recaídas es menor al 20%. Los microRNAs (miRNAs) han sido identificados como modificadores clave de la expresión génica, y participan en prácticamente todos los procesos celulares, incluyendo el desarrollo y progresión de células malignas. El conocimiento de los perfiles de expresión de miRNAs y sus genes blancos, permite identificar las vías metabólicas involucradas en la transformación celular, lo cual puede ser la base de nuevas estrategias terapéuticas con blancos moleculares específicos. El objetivo de este estudio fue determinar si existe un patrón de expresión diferencial de miRNAs en suero de individuos con OS en comparación con individuos sanos de población mexicana.

Metodología: Se obtuvieron 15 muestras de suero de individuos con OS y se compararon con el suero de individuos sanos. Se realizaron arreglos de baja densidad mediante sondas TaqMan (TLDA) con 384 pozos con sondas TaqMan de expresión. Se obtuvo un perfil de miRNAs sobreexpresados. Se realizó un análisis *in silico* para encontrar los genes blanco de dichos miRNAs. Se seleccionaron seis miRNAs, de acuerdo con su participación en el ciclo celular, para su posterior validación por RT-qPCR.

Resultados. De los seis miRNAs seleccionados de acuerdo con su participación en el ciclo celular, miR-215 y miR-642 mostraron expresión diferencial

estadísticamente significativa en la validación. Mientras que miR-320a, miR-99b-5p, miR-376c-3p y miR-655-3p presentaron un valor de p no significativo. Sin embargo, se observó una clara tendencia a la sobreexpresión en los afectados.

Conclusiones. Se identificó un perfil de expresión diferencial de los miRNAs en los sueros de individuos con osteosarcoma. La expresión diferencial de miR-215-5p, miR-320a, miR-99b-5p se ha reportado en osteosarcoma. El primer miRNA se ha asociado a la resistencia de metotrexato, el segundo con la presencia del tumor y la diferenciación de la variedad osteoblástica de la condroblástica, y el tercero con una buena respuesta a tratamiento con ifosfamida. Sin embargo, también encontramos sobreexpresados a miR-642-5p, miR-376c-3p y miR-655-3p, los cuales han sido relacionados en la progresión, metástasis y resistencia a la quimioterapia en otros tumores. Se necesitan más estudios para identificar marcadores específicos para mejorar el diagnóstico y la sobrevida de los pacientes con osteosarcoma.

Palabras claves: *osteosarcoma, microRNAs, TLDA.*

Introducción

Epidemiología

El Osteosarcoma (OS) es el tumor maligno primario de hueso más frecuente, afecta principalmente el esqueleto apendicular, es decir los huesos de las extremidades, de individuos entre la primera y segunda década de vida. Su incidencia global es de 0.2-0.3/100,000 por año, elevándose en adolescentes entre los 15 y los 19 años a 0.8 -1.1/100,000 por año, y representa más del 10% de todos los tumores sólidos¹. En E.U.A. se reportan 900 casos nuevos por año². En México según el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas, la incidencia de tumores óseos malignos es de 0.7/100,000 habitantes. Sin embargo, no existe una incidencia nacional del OS, debido a que el sistema de salud está dividido en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), los Institutos Nacionales de Salud que pertenecen a la Secretaría de Salud (SSA). En el IMSS se han realizado varios estudios sobre la frecuencia del cáncer, entre 1996-2001 se reportaron 97 tumores óseos; de estos, 70 fueron osteosarcomas (72.2%)³. En otro estudio, realizado entre 2005-2014, el OS representó el 56.2% de tumores óseos malignos⁴. En la SSA, se identificaron 161 tumores óseos malignos, de los cuales 75 fueron OS. La frecuencia del OS en el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) fue del 46.6% de los tumores óseos malignos (13.3% del total de los tumores óseos) entre el 2000-2005⁵.

En México, de acuerdo a la Comisión Nacional de Protección en Sistema de Salud y el Sistema de Fondos de Protección de Gastos Catastróficos, la incidencia de cáncer en menores de 18 años se elevó a 14,178 casos entre 2008 a 2014, con una incidencia de 156.9 casos/millón⁶. El OS representa el 5.2% del cáncer en la infancia y la adolescencia, con una incidencia de 0.8 casos por cada 100, 000 individuos, siendo similar a lo reportado en la literatura mundial. Entre las principales causas de cáncer en menores de 18 años, entre 2008 y 2012, el OS presentó las siguientes frecuencias: en mujeres conforma el 7% entre 10 -14 años y el 6.7% entre 15 y 17

años. En varones entre 5-9 años representa el 2.8%, entre 10-14 años el 7.5% y entre 15-17 años el 8.3% de las neoplasias malignas en la infancia y adolescencia⁷.

Fisiopatología

Actualmente se desconoce los procesos patológicos relacionados con el osteosarcoma. Sin embargo, existe evidencia de factores que predisponen a esta neoplasia. Entre ellos se encuentra el antecedente de radiación ionizante para el tratamiento de tumores sólidos, favoreciendo el desarrollo de un osteosarcoma secundario en las dos décadas posteriores al uso de la radioterapia⁸. Otro factor asociado es la enfermedad de Paget, también conocida como osteítis deformante, es un desacoplamiento de la formación y resorción ósea que da como resultado un índice acelerado de recambio óseo. La incidencia del osteosarcoma secundario a la enfermedad de Paget es del 0.7-1%⁹. Un tercer factor de riesgo, son los aspectos genéticos, donde la presencia de mutaciones germinales de los genes *TP53*¹⁰, *WRN*¹¹, *RECLQ4*¹², *BLM*¹³ y *RB1*¹⁴ condicionan a síndromes de predisposición a cáncer o cáncer hereditario. Estos genes participan en los diferentes procesos de reparación del DNA.

Dentro de los síndromes de predisposición a cáncer que llegan a presentar OS se encuentran los siguientes:

- El síndrome de Li-fraumeni es un síndrome de cáncer hereditario causado por mutaciones en el gen *TP53*, localizado en el cromosoma 17p13.1. Tiene una herencia autosómico dominante. Su prevalencia es de 1:5,000 - 20,000 personas. Se caracteriza por presentar diferentes neoplasias primarias como cáncer de mama, sarcomas de tejidos blandos u osteosarcomas, tumores de cerebro y carcinoma adrenocortical¹⁰.
- El síndrome de Werner se caracteriza por un envejecimiento prematuro y predisposición a cáncer como osteosarcomas, sarcomas de tejido blando,

melanoma y cáncer de tiroides. El gen afectado es *WNR*, ubicado en el locus 8p12. Tiene una prevalencia de 1:380,000 - 1,000,000 de individuos¹¹.

- El síndrome de Rothmund-Thomson es un síndrome de predisposición a cáncer. Clínicamente se caracteriza por alteraciones en piel como poiquilodermia, cabellos, cejas y pestañas esparcidos, talla baja, alteraciones esqueléticas, dentales, cataratas y predisposición principalmente a osteosarcoma. Se han reportado alrededor de 400 casos a nivel mundial. Esta ocasionado por mutaciones en el gen *RECQL4*, localizado en 8q24.3¹².
- El síndrome de Bloom es un trastorno caracterizado por un severo retraso en el crecimiento, alteraciones del tejido adiposo subcutáneo, y predisposición a una gran variedad de cánceres. El gen afectado es *BLM* y su locus es 15q26.1¹³.
- Por último, está el Retinoblastoma, caracterizado por desarrollar tumores intraoculares originados en la retina. El gen mutado es *RB1*, ubicado en el cromosoma 13q14.2¹⁴.

Cuadro clínico

El OS se presenta como una enfermedad localizada al esqueleto apendicular (65%)¹⁵, afecta principalmente el tercio distal del fémur, el tercio proximal de la tibia, seguido del tercio proximal del húmero. El OS clásicamente se considera un tumor metafisiario, por lo que se ha asociado con el rápido crecimiento óseo, lo cual se correlaciona con el pico de incidencia en la adolescencia y adultos jóvenes⁹. Clínicamente se caracteriza por ser una tumoración dura, firme y fija a planos profundos. Los datos típicos que los pacientes refieren son inflamación y dolor del área afectada. El dolor es inicialmente insidioso que se relaciona con la actividad física, progresando rápidamente de intensidad y frecuencia, presentándose durante el reposo, motivo por el que los pacientes acuden a valoración médica. La media del tiempo desde el inicio de los síntomas hasta el diagnóstico es de 4 meses⁹.

Ocasionalmente los pacientes lo relacionan erróneamente con un traumatismo previo. Dependiendo de la localización, se puede acompañar de disminución de la movilidad en las articulaciones adyacentes. Raramente conlleva a fracturas patológicas (~5%). Algunos pacientes pueden presentar elevación de la fosfatasa alcalina (40%) y deshidrogenasa láctica (LDH) en el 30% de los casos. Estas enzimas tienen un valor pronóstico, los niveles normales de la fosfatasa alcalina previo al tratamiento se han asociado con una mejor supervivencia a 5 años y a un periodo mayor sin recurrencia de la enfermedad¹⁶.

Diagnóstico

El diagnóstico se basa en la sospecha clínica, con apoyo de estudios radiológicos, el estudio de histopatología confirma el diagnóstico. En las radiografías el osteosarcoma se observa como una tumoración metafisiaria con apariencia radiodensa mixta, lesiones líticas. Típicamente se puede observar destrucción cortical y reacción periosteal⁹. Frecuentemente hay involucro de tejidos blandos adyacentes. Un dato clásico, pero no específico, es el triángulo de Codman, que es una elevación del periostio en la periferia del tumor. El osteosarcoma se mineraliza de forma centrifuga (Figura 1).

La resonancia magnética del hueso afectado permite evaluar el involucro de los tejidos blandos, la proximidad de las estructuras periféricas y la presencia de metástasis saltatorias, como en los ligamentos cruzados cuando hay involucro de la rodilla. El método de elección para evaluar las metástasis pulmonares es la tomografía computarizada (TAC), sin embargo, su limitante es no detectar metástasis menores de 5 mm, motivo por el cual se recomienda repetir el estudio de imagen cada 6 a 12 semanas. El gammagrama óseo con tecnecio⁹⁹ sirve para evaluar lesiones óseas metastásicas. El estudio de tomografía por emisión de positrones (PET) se utiliza para evaluar la respuesta histológica a la quimioterapia y/o predecir la progresión libre de enfermedad⁹.



Figura 1. Radiografía AP (A) y lateral (B) de osteosarcoma en fémur distal donde se observa una lesión mixta radiodensa y radiolúcida con reacción periostial. Radiografía AP (C) y lateral (D) que demuestra una lesión en la diáfisis del húmero con destrucción cortical extensiva. Tomado de Geller⁹.

La toma de la biopsia se debe de realizar en un centro especializado por un equipo multidisciplinario de médicos con experiencia en osteosarcoma. Se prefiere la biopsia incisional “abierta” debido a que se puede obtener mayor cantidad de tejido, además tiene una tasa de diagnóstico de mayor certeza a comparación de la biopsia por aspiración con aguja. El diagnóstico histológico del osteosarcoma se basa en la presencia de tejido estromal maligno sarcomatoso asociado con la producción osteoide tumoral. Los osteosarcomas derivan de células madre mesenquimales capaces de diferenciarse hacia tejido óseo, fibroso o cartilaginoso. De acuerdo con la clasificación histológica, el osteosarcoma se divide en alto y bajo grado, y se subdividen de acuerdo con el componente celular predominante, el cual debe de estar en más del 50% del área del tumor¹⁷. Los subtipos de osteosarcoma de alto grado son el osteoblástico, condroblástico, fibroblástico, telangiectásico y de células pequeñas, estos representan el 80-90% de todos los casos de OS^{1,8,9} (Tabla y Figura 2).

Tabla 1. Variedad histológica del osteosarcoma y sus características.

	Tipo de osteosarcoma	Características
Alto grado	Osteosarcoma osteoblástico (50%)	Presenta abundante producción de osteoide inmaduro, con forma de un patrón cordonal alrededor de las células tumorales. Mineralización es variable.
	Osteosarcoma fibroblástico (~25%)	Compuestos por abundante estroma formado por células ahusadas, de alto grado. Presenta producción focal osteoide.
	Osteosarcoma condroblástico (~25%)	Produce una matriz cartilaginosa de bajo grado que predomina en la mayoría del tumor. Pocas zonas con células anormales de altamente malignas. En los focos condroblásticos se localizan las células ahusadas productoras de osteoide maligno.
	Osteosarcoma telangiectásico	Esta altamente vascularizado, contienen poco material osteoide. Lesiones líticas (similar al quiste óseo aneurismático o Tumores de células gigantes quísticos). Formado por múltiples espacios quísticos hemorrágicos, sin masas solidas adyacentes, debido a que presenta poca celularidad. Presente mínima cantidad de osteoide tumoral, con abundantes células gigantes multinucleadas pleomórficas
Bajo grado	Osteosarcoma de células pequeñas	Material osteoide maligno acompañada de células pequeñas. Diagnóstico complicado debido a similitud con otros tumores como el sarcoma de Ewing
	Osteosarcoma multifocal	Se presenta con múltiples lesiones sincrónicas El pronóstico es malo Puede desarrollar otras lesiones años después del tratamiento (metacrónico) principalmente el OS metacéntrico
	Osteosarcoma de superficie	También llamados yuxtacorticales Tienen buen pronóstico sin quimioterapia Se subdivide en: <ul style="list-style-type: none"> • Paraosteal: es una lesión superficial formada por los fibroblastos de bajo grado que producen el hueso laminar. Se presentan en pacientes adultos <p>Se origina en la cortical. Con el tiempo, puede invadir la cortical y entrar en la cavidad endóstica. El</p>

		<p>tratamiento es quirúrgico y la supervivencia a largo plazo es de 80% a 90%.</p> <ul style="list-style-type: none">• Osteosarcoma perióstico: también llamado osteosarcoma yuxtacortical. Es una lesión de superficie, condroblástica, de moderado grado de malignidad. Se presentan en pacientes adultos. El riesgo de metástasis es alto.• Osteosarcomas yuxtacorticales de alto grado: es de histología similar a la del osteosarcoma al convencional. Se diferencia del anterior por ser de superficie.
--	--	--

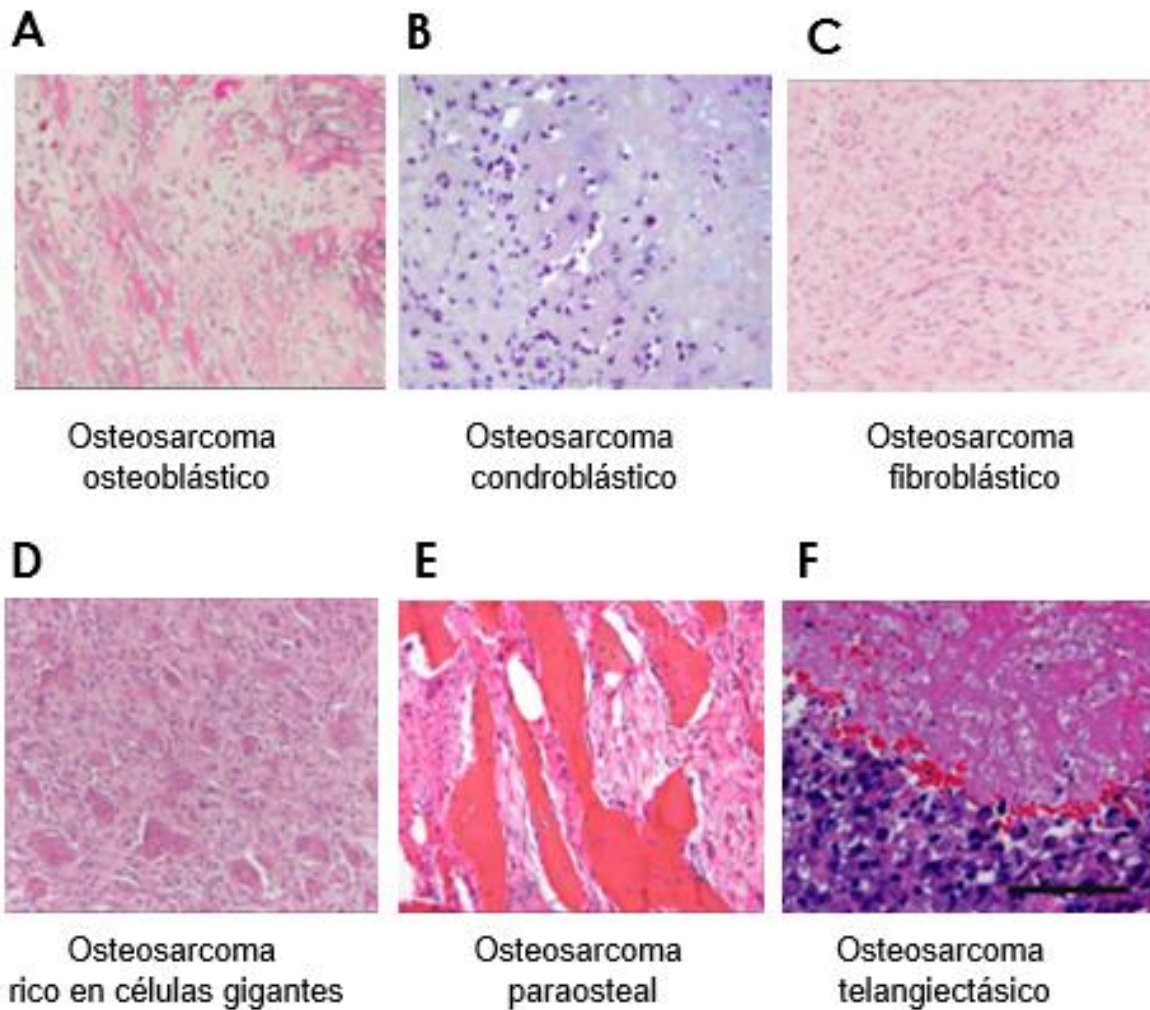


Figura 2. Variedades histológicas del osteosarcoma. Tinciones H&E. **A.** con hueso neoplásico de tipo filigrana. **B.** OS condroblástico se observan áreas grandes de matriz condroide. **C.** OS fibroblástico, muestra grandes áreas de diferenciación fibroblástica con osteoide. **D.** OS rico en células gigantes, presenta numerosas células gigantes. **E.** OS paraosteal, se observa diferenciación fibro-ósea típica. **F.** OS telangiectásico, caracterizado por abundantes áreas hemorrágicas, con fibrina y células tumorales pleomórficas. Modificado de L. Chang, *et. al.*¹⁸

El Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC, American Joint Committee for Cancer) propuso el uso del sistema TGNM, el cual se utiliza para sarcomas de tejidos blandos, y evalúa el tamaño de la neoplasia primario (T= tumor), el grado histopatológico (G = grado), ganglios linfáticos afectados (N = nódulos) y la presencia de metástasis (M). Dicha clasificación no es útil para valorar los osteosarcomas. En 1977 se propuso la clasificación de Enneking (Tabla 2), que tiene como objetivo estadificar los sarcomas musculoesqueléticos, principalmente los localizados en el esqueleto axial, con el objetivo de planear un tratamiento quirúrgico, así como establecer el pronóstico. Esta clasificación divide a los sarcomas musculoesqueléticos en benignos y malignos. Los benignos a su vez se subdividen en latentes, activos y agresivos. Mientras que los sarcomas malignos se dividen de acuerdo al grado quirúrgico, la extensión local y la presencia de metástasis.¹⁹

Tabla 2. Clasificación de Enneking para tumores musculoesqueléticos malignos¹⁹.

ESTADIO	GRADO	SITIO	METÁSTASIS
IA	Bajo grado (G1)	Intracompartimental (T1)	No metástasis (M0)
IB	Bajo grado (G1)	Extracompartimental (T2)	No metástasis (M0)
IIA	Alto grado (G2)	Intracompartimental (T1)	No metástasis (M0)
IIB	Alto grado (G2)	Extracompartimental (T2)	No metástasis (M0)
III	Cualquier (G)	Cualquiera (T)	Regionales o a distancia

Tratamiento

El 80% de los pacientes con OS presenta una enfermedad localizada², por lo que el tratamiento definitivo es la resección quirúrgica del tumor, asegurándose de dejar márgenes libres de células tumorales. Dependiendo de la evolución del osteosarcoma, se tiene la opción de una cirugía conservadora, donde se realiza la resección del tumor junto con la reconstrucción mediante una prótesis. El otro extremo, es la amputación o la desarticulación del hueso afectado. El tratamiento médico, consta de la quimioterapia, la cual se clasifica en neoadyuvante y adyuvante. La quimioterapia neoadyuvante, es aquella que se administra previo a la cirugía, esperando que el tumor responda adecuadamente. Los fármacos quimioterapéuticos que se utilizan son doxorrubicina, cisplatino, metotrexato e ifosfamida¹. Se ha comprobado que el uso combinado de doxorrubicina y metotrexato tiene una tasa libre de enfermedad de 60%⁹. Posterior a la cirugía se evalúa el grado de necrosis tumoral en la pieza quirúrgica. Lo que permite ajustar los fármacos durante la quimioterapia adyuvante. De acuerdo con los criterios de Huvo²⁰⁻²², se considera buena respuesta cuando la necrosis tumoral es >90%. Esta respuesta es frecuente en las variantes condroblásticas y osteoblásticas⁸. Esta evaluación tiene valor pronóstico en la evolución de la enfermedad. Contrariamente a otras neoplasias, se ha visto que el osteosarcoma no responde a la radioterapia, motivo por el cual no se implementa en el tratamiento.

Mortalidad vs. Supervivencia

La mortalidad del OS es de 0.15 casos/100, 000 individuos al año¹⁵. La supervivencia a 5 años, en ausencia de metástasis, es de 70%. El OS es un tumor que genera metástasis rápidamente. Algunos autores consideran que el 80% de los pacientes tienen micrometástasis al momento del diagnóstico⁹ y solo del 10-20% de los pacientes tienen evidencia de metástasis macroscópicas. En presencia de éstas, la supervivencia a 5 años no supera el 20%. Las recaídas ocurren en los primeros dos años del tratamiento inicial, el 80-90% de los casos presentan diseminación

hematógena de las células neoplásicas produciendo metástasis en pulmón. Los pacientes que tienen mejor pronóstico son aquellos que tienen menos de 3 nódulos metastásicos y son unilaterales⁹. Existen otro tipo de metástasis denominadas saltatorias, éstas representan eventos locales afectando el mismo hueso que fue afectado por el tumor primario, también conocidas como recaídas. Las recaídas se presentan en 1-2% de los afectados después de los 5 años del tratamiento¹⁵. Además, se ha observado resistencia a la quimioterapia en el 35% de los casos, lo que impacta en la supervivencia. La supervivencia a 5 años en casos de recaída no supera el 20%. A pesar de todos estos esfuerzos recientes no se ha logrado modificar la supervivencia a largo plazo de estos pacientes durante los últimos 25 años. En parte se debe a la carencia de marcadores específicos para el diagnóstico y evolución de la enfermedad.

MicroRNAs

Como ya se mencionó previamente hay algunos genes (*RB*, *p53*), rearrreglos cromosómicos que conllevan a ganancia o pérdida de segmentos cromosómicos, o incluso cambios epigenéticos involucrados en el desarrollo del osteosarcoma. Se han realizado diversos esfuerzos para encontrar marcadores específicos de esta enfermedad mediante metodologías genómicas, dentro de ellos destacan los microRNAs (miRNAs). Los primeros miRNAs fueron descubiertos en la década de los 90 en experimentos con *Caenorhabditis elegans* y fueron involucrados en el control del desarrollo temprano de este organismo. Años posteriores, se encontraron codificados en el genoma humano. Hasta la fecha se conocen aproximadamente 1,000 miRNAs en el humano²³.

Los miRNAs han surgido como moléculas clave en la regulación de la expresión génica. El 30-80% de los genes son regulados por miRNAs²⁴, además tienen la peculiaridad de que un solo miRNA puede regular cientos de genes y un gen puede estar regulado por diferentes miRNAs. Los microRNAs son moléculas pequeñas de RNA no codificantes de 22 a 24 nucleótidos. Estas moléculas de RNA son transcritas en el núcleo por la RNA polimerasa II en su mayoría, aunque algunos pocos miRNAs por la RNA polimerasa III, como moléculas largas de RNA (3-4 Kb) llamados microRNAs primarios (pri-miRNAs). Los pri-miRNAs son procesados por Drosha, una ribonucleasa III²³, dando origen a moléculas de 60-70 nucleótidos llamados pre-miRNAs. Los pre-miRNAs son exportados al citoplasma por Exportina-5. Una vez en el citoplasma los pre-miRNAs son procesados por Dicer, quien elimina el asa que une ambas cadenas de los pre-miRNAs, originando una molécula de RNA de doble cadena de 22-24 nucleótidos. Dicer se asocia al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) para llevar a cabo el silenciamiento génico post-transcripcional mediado por miRNA junto con la proteína de unión a RNA sensible a la transactivación (TRBP) que mejora la fidelidad de la escisión y recluta a la proteína Argonauta (AGO). AGO lleva al miRNA maduro, mientras que la cadena complementaria se disocia y degrada, lo que da como resultado un miRNA completamente activo. La unión de RISC al RNAm está mediada por la secuencia

semilla, compuesta de 2-8 nucleótidos localizada en el extremo 5' del miRNA maduro.²⁵ Los microRNAs tienen la capacidad de regular la vida media del RNAm al unirse por complementariedad de bases a su extremo 3' *UTR* y promover su degradación o mediante la represión de la traducción del RNAm (Figura 3). El prefijo 3' o 5' en el nombre de estas moléculas indican el extremo del que se originaron a partir del pre-miRNA (Tabla 3).

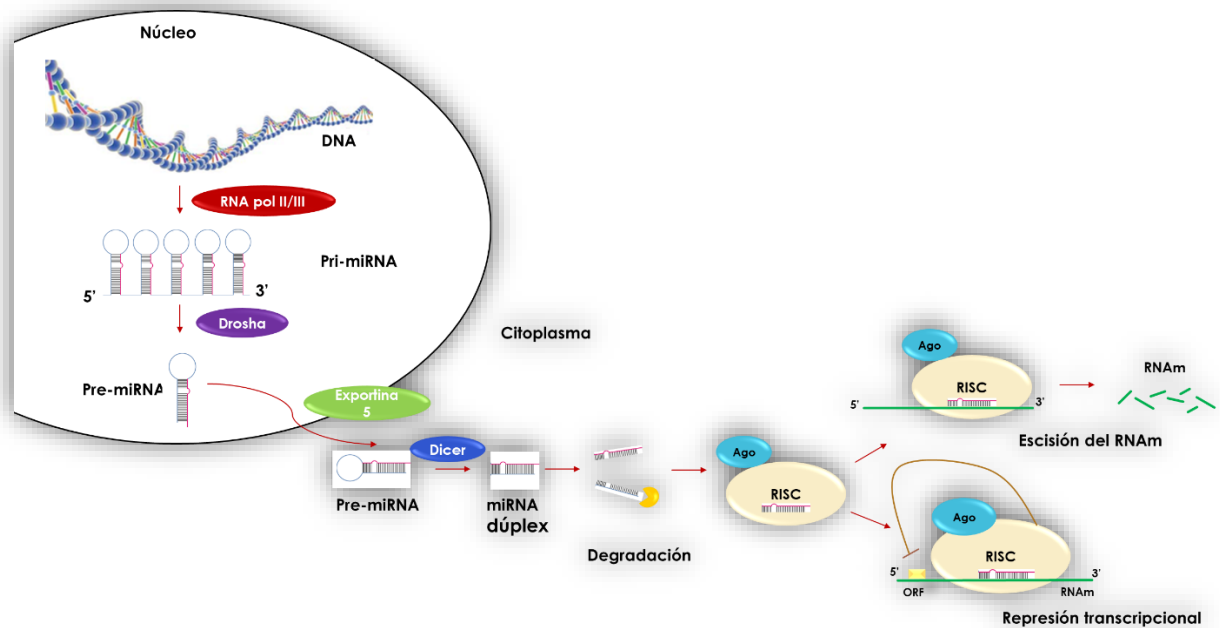


Figura 3. Biogénesis, procesamiento y mecanismo de acción de los miRNAs

Tabla 3. Nomenclatura de los miRNAs²⁴

Acrónimo	Significado	Ejemplo
Prefijo de 3 letras	Identificación de la especie	<i>hsa</i> (<i>Homo sapiens</i>) <i>cel</i> (<i>Caenorhabditis elegans</i>)
pri-mir (“r” minúscula)	Transcrito primario de miRNA	pri-mir-1
pre-mir (“r” minúscula)	Transcrito precursor del miRNA resultando del procesamiento por Drosha	pre-mir-1
miR (“r” mayúscula)	miRNA maduro	hsa-miR-1
-3p or -5p	miRNA maduro originado del extremo 3' o 5' del pre-miRNA, respectivamente	hsa-miR-10-3p hsa-miR-10-5p
a o b	Variantes del miRNA maduro (ej. Difieren por un nucleótido)	hsa-let 7a hsa-let 7b
-1 o -2	Secuencias Idénticas de miRNA maduro que se originan de diferente loci	hsa-miR-9-1 hsa-miR-9-2
miR* (miR-star)	“cadena pasajera” es decir que se encuentra en baja concentración, frecuentemente degradado	hsa-miR-9*
miR, miRNA, microRNA	Términos equivalentes de miRNA maduro	

El transporte extracelular de los miRNAs es mediado por las proteínas AGO y por microvesículas extracelulares derivadas de los exosomas o endosomas, lo que permite su estabilidad en el torrente sanguíneo. Esta característica les ha permitido ser utilizados como marcadores no invasivos. Ha sido posible correlacionar cambios en los patrones de expresión de miRNAs con distintas enfermedades, como cáncer²⁶, enfermedades autoinmunes^{27,28}, cardiovasculares²⁹⁻³¹, infecciosas^{32,33} solo por mencionar algunas. Referente a osteosarcoma existen varios artículos en los que se han logrado identificar algunos miRNAs expresados a alta o a la baja, y algunos de ellos proveen un factor de riesgo o protector. Sin embargo, el papel individual de los miRNAs involucrados en la progresión del osteosarcoma aún no está completamente dilucidado (Tabla 4). Por ejemplo, el miR-505 se han expresado a la baja en el osteosarcoma y está relacionado con la proliferación, migración e invasión celular teniendo como gen blanco a *HMGB1* (high-mobility group box 1)³⁴. La expresión a la baja de miR-182 y miR-183 se han correlacionado con el estadio clínico (TNM), la presencia de metástasis, la recurrencia del osteosarcoma y también con una pobre supervivencia de estos individuos³⁵. El miR-328-3p, también se han expresado a la baja, y se ha comprobado que la sobreexpresión de este miRNA, inhibe la proliferación celular, promoviendo la apoptosis mediante el aumento de la radiosensibilidad del osteosarcoma a través de *H2AX*³⁶. miR-564 está expresado a la baja en pacientes y líneas celulares de osteosarcoma. Su expresión al alta de miR-564 regula negativamente a Akt, lo que induce a la disminución de la glucólisis y la proliferación celular³⁷. Sin embargo, los resultados obtenidos en diferentes estudios no siempre son concordantes por lo que es necesario identificar aquellos miRNAs que tengan una mayor utilidad clínica. Recientemente, se realizó un meta-análisis de los miRNAs relacionados al osteosarcoma, en el cual se incluyeron 17 artículos acerca de los perfiles de expresión de los miRNAs analizados en suero o plasma de humanos con osteosarcoma. Se encontró 17 miRNAs sobreexpresados (miR-222; miR-27a; miR-221; miR-199a-5p; miR-191; miR-195-5p; miR-199a-3p; miR-320a; miR-374a-5p; miR-148a; miR-199b-5p/miR-124; miR-21; miR-25-3p; miR-17-5p; miR-300; miR-451/miR-124; miR-181b/miR-124)b y ocho microRNAs expresados a la baja (miR-

326; miR-223; miR-152; miR-195; miR-199a-3p; miR-143; miR-491-5p; miR-125b), los cuales han sido asociados con las características clínico-patológicas del osteosarcoma (Tabla 5)³⁸. Estos miRNAs se podrían considerar como biomarcadores, tanto como para diagnóstico y un tratamiento dirigido a los pacientes con osteosarcoma. Hasta la fecha, en México no se han realizado estudios que analicen el perfil de miRNAs en pacientes con OS.

Tabla 4. Estudios de perfiles de expresión de miRNAs y su relación clínica con osteosarcoma. Modificado de Zhou, et. al.³⁹

Referencia	Tipo de estudio	Técnica	miRNA	Nivel de expresión	Gen blanco	Función	
Zhang et al. 2010 ⁴⁰	Tumorigenesis	Osteosarcoma vs tejido normal adyacente; línea celular de osteosarcoma vs línea celular de osteoblástica	qRT-PCR	143	a la baja	<i>BCL2</i> Reduce la viabilidad celular, promueve apoptosis <i>in vitro</i> , suprime la tumorigenesis <i>in vivo</i> Metástasis	
Ziyan et al. 2011 ⁴¹		Osteosarcoma vs hueso normal	qRT-PCR	21	al alta	<i>RECK</i> Induce a invasión/migración	
Liu et al. 2011 ⁴²		Osteosarcoma vs tejido no canceroso	qRT-PCR	125b	a la baja	<i>STAT3</i> Inhibe la proliferación/migración	
Jones, KB et al. 2012 ⁴³		Osteosarcoma vs. hueso normal; línea celular de osteosarcoma	Microarreglos; qRT-PCR	let-7g, 142-5p, 16, 223, 26b, 29b, 451	a la baja	<i>BCL2</i> <i>NFAT5</i>	miR-451 tuvo una correlación positiva a la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante.
				181, 27a	al alta		miR-27a es promueve las metástasis en OS y línea celulares osteoblásticas
Thayanithy et al. 2012 ⁴⁴		Osteosarcoma vs. hueso normal; línea celular de osteosarcoma vs osteoblastos	Microarreglos; qRT-PCR	382, 134, 369-3p, 544	a la baja	<i>MYC</i> El grupo miR-17-92 expresado a la baja induce a apoptosis	
Osaki et al. 2011 ⁴⁵	Metástasis	Línea celular metastásica vs línea celular no metastásica	Microarreglos; qRT-PCR	143	a la baja	<i>MMP13</i> Suprime las metástasis pulmonares	
Huang et al. 2012 ⁴⁶		Expresión celular baja de FAS en metástasis vs alta expresión celular de FAS en no metástasis	Microarreglos; qRT-PCR	20a	al alta	<i>FAS</i> Disminuye la sensibilidad a FASLG, promueve metástasis pulmonares	
Montanini et al. 2012 ⁴⁷		Línea celular de osteosarcoma y cultivo primario de osteosarcoma vs osteoblastos normales; metástasis pulmonar vs osteosarcoma primario	Secuenciación; qRT-PCR	93	al alta	- Incrementa la proliferación celular/ invasión Resistencia a tratamiento	

Referencia	Tipo de estudio	Técnica	miRNA	Nivel de expresión	Gen blanco	Función
Zhang et al. 2014 ⁴⁸	Metástasis	Osteosarcoma vs hueso normal y suero	qRT-PCR	133b, 206	a la baja	Osteosarcoma de alto grado, presencia de metástasis y recurrencia
Zhang et al. 2014 ⁴⁹		Osteosarcoma vs hueso normal y suero	qRT-PCR	196a, 196b	al alta	Osteosarcoma de alto grado, presencia de metástasis y recurrencia
Ma et al. 2014 ^{50g}		Suero en pacientes con osteosarcoma	qRT-PCR	148	al alta	Tamaño del osteosarcoma, presencia de metástasi
Song et al. 2009 ⁵¹	Resistencia a tratamiento	Osteosarcoma tratado con doxorubicina, cisplatino y ifosfamida xenoinjertos vs xenoinjertos no tratados	qRT-PCR	181a, 181b	al alta	
He et al. 2009 ⁵²		Tratamiento con adriamicina e irradiación vs no tratados	qRT-PCR	34a, 34b, 34c	al alta	Induce el arresto de G1 y apoptosis dependiente de TP53
Gougelet et al. 2011 ⁵³		Buena respondedores vs malos respondedores a ifosfamida	TLDA	92a, 99b, 193a-5p, 421a	al alta	
				132	a la baja	

Tabla 5. Características clínico-patológicas de los perfiles de expresión de miRNAs de suero/plasma de pacientes con osteosarcoma. Tomado de Hong et al³⁸.

Características clínico-patológicas	Expresión de miRNAs
Tiempo de supervivencia	miR-195, miR-27a, miR-221, miR-326, miR-148a, miR-152, miR-222, miR-223, miR-191, miR-491- 5p, miR-300
Tamaño del tumor	miR-148a, miR-222, miR-191
Diferenciación celular	miR-326
Estadio TNM	miR-195, miR-27a, miR-221, miR-326, miR-222, miR-223, miR-191, miR-491-5p, miR-300
Metástasis	miR-195, miR-27a, miR-221, miR-326, miR-21, miR-143, miR-148a, miR-222, miR-223, miR-191, miR-195-5p, miR-199a-3p, miR-491-5p, miR-300
Invasión tumoral	miR-326, miR-223
Subtipo histológico	miR-21, miR-143, miR-199a-3p, miR-199a-3p, miR-320a
Radioterapia/ quimioterapia	miR-27a una alta expresión se relaciona con una pobre respuesta a la quimioterapia

Planteamiento del problema

El osteosarcoma es el tumor maligno de hueso más común, afectando principalmente a niños y adolescentes. El diagnóstico se basa en la sintomatología, en estudios de imagen y se corrobora mediante biopsia. Un alto porcentaje de casos terminan en amputación de la extremidad, debido a un diagnóstico tardío, presentando una mortalidad de 0.15 casos/100, 000 individuos al año. Uno de los factores que ha impedido mejorar la tasa de supervivencia en los últimos 25 años, es la carencia de métodos de detección oportuna y de marcadores tumorales específicos. Los perfiles diferenciales de expresión de miRNAs, han contribuido al conocimiento sobre la biogénesis de diversas neoplasias. Al tener un conocimiento más amplio del análisis de miRNA en osteosarcoma, se puede comprender mejor la biogénesis y mecanismo de resistencia, para que en un futuro próximo puedan utilizarse como biomarcadores específicos de forma que permita un diagnóstico oportuno y brindar un tratamiento personalizado de los pacientes con osteosarcoma.

Pregunta de investigación

¿Existe un patrón diferencial de expresión de miRNAs en suero de pacientes mexicanos con osteosarcoma primario en comparación con individuos sanos?

Justificación

El osteosarcoma (OS), es un tipo de cáncer común que afecta principalmente a niños y adolescentes. En México representa el 6.3% del total de las neoplasias según el INEGI y es la segunda causa de cáncer en pacientes de 10 a 14 años, según el Registro Histopatológico de Neoplasia Malignas (RHNM). El osteosarcoma tiene una tasa de mortalidad muy alta, en parte debido a que no se diagnostica ni se trata en etapas iniciales ya que se carece de métodos de detección oportuna, así como de marcadores tumorales. De este modo si se investigan los perfiles de expresión de miRNAs en este tipo de pacientes, podremos establecer la base para una herramienta de apoyo diagnóstico y ofrecer una atención oportuna a fin de mejorar la calidad de vida de los afectados. Esto permitirá optimizar los recursos humanos y materiales que se destinan al manejo de los individuos afectados. Además, este conocimiento contribuirá a entender mejor los mecanismos moleculares que llevan al desarrollo del tumor.

Hipótesis

Existe un patrón de diferencial de expresión de miRNAs en suero de pacientes mexicanos con osteosarcoma primario, en comparación con individuos sanos.

Objetivos

Objetivo general

- Determinar si existe un patrón de expresión diferencial de miRNAs en suero de pacientes mexicanos con osteosarcoma primario en comparación con individuos controles sanos.

Objetivos específicos

- Identificar y validar los miRNAs que muestren una expresión diferencial entre pacientes y controles y que tengan una potencial aplicación como herramienta de apoyo al diagnóstico.
- Identificar los genes blanco y las vías metabólicas involucradas reguladas por los miRNAs con expresión diferencial.
- Contribuir con el conocimiento de las bases moleculares que llevan a la transformación celular del osteosarcoma.

Metodología

Tipo de estudio: analítico, observacional, transversal.

Población de estudio

Mediante un muestreo a conveniencia, se reclutaron pacientes con diagnóstico de osteosarcoma tratados en el servicio de Tumores Óseos del Instituto Nacional de Rehabilitación, Luis Guillermo Ibarra Ibarra, en un periodo comprendido entre abril 2015 a febrero 2017. Una vez confirmado el diagnóstico de osteosarcoma mediante biopsia, los pacientes fueron invitados a participar de manera secuencial conforme asistieron a la consulta del servicio de Tumores óseos.

Adicionalmente, se constituyó un grupo control, con individuos clínicamente sanos, mediante la realización de la historia clínica completa pareados por edad y sexo a los individuos con OS, de los cuales se tomó una muestra sanguínea periférica para la obtención de suero.

Criterios de selección

Criterios de inclusión:

CASOS:

- Individuos mexicanos de sexo femenino o masculino, que tengan diagnóstico clínico de osteosarcoma.
- Individuos de entre 10-40 años con diagnóstico de osteosarcoma.
- Individuos en que el diagnóstico de osteosarcoma sea confirmado histopatológicamente mediante biopsia.
- Individuos con osteosarcoma valorados y tratados por el servicio de Tumores óseos del Instituto Nacional de Rehabilitación.
- Individuos con osteosarcoma que reciban tratamiento de quimioterapia y/o tratamiento quirúrgico en el Instituto Nacional de Rehabilitación.

CONTROLES:

- Individuos clínicamente sanos, pareados por edad y sexo con los individuos con osteosarcoma.

Criterios de exclusión:

- Individuos con osteosarcoma secundario o asociado a enfermedad de Paget.
- Individuos con osteosarcoma asociado a un síndrome de cáncer hereditario
 - Síndrome de Li-fraumeni
 - Síndrome de Werner
 - Síndrome de Rothmund- Thomson

- Síndrome de Bloom
- Retinoblastoma

Criterios de eliminación

- Individuos en los que la muestra de suero sea insuficientes o inadecuadas para la extracción de RNA.

Descripción de variables

	<i>Definición conceptual</i>	<i>Definición operacional</i>	<i>Tipo de variable</i>	<i>Escala de medición</i>
<i>Variable independiente</i>	<u>Osteosarcoma</u> neoplasia maligna primaria de hueso	Tejido estromal maligno sarcomatoso asociado con la producción osteoide tumoral	Cualitativa nominal Dicotómica	Enfermo No enfermo
<i>Variable dependiente</i>	<u>miRNAs</u> RNAs no codificantes de 19 - 20 nucleótidos	Niveles de expresión de miRNAs	Cuantitativa de intervalo	Expresión relativa mediante $\Delta\Delta Ct$ comparativo

Descripción de los procedimientos

Se reclutaron pacientes con osteosarcoma primario, tratados en el servicio de Tumores Óseos en el Instituto Nacional de rehabilitación (INR) desde febrero de 2015 hasta abril de 2017. Aquellos individuos que cumplían con los criterios de inclusión, se les invitó a participar en la investigación. Se firmó el consentimiento informado y posteriormente se obtuvieron las muestras sanguíneas.

Toma de muestras de sangre periférica

Se limpió con una torunda alcoholada la zona a puncionar para desinfectar. Con una jeringa estéril se tomó una muestra de 10 ml de sangre y se colocaron 5ml de sangre en cada tubo amarillo (SST marca BD Vacutainer®). En total se obtuvieron 2 tubos amarillos por cada paciente y control. El procesamiento de las muestras de sangre se hizo en las primeras dos horas posteriores a la toma de la muestra de sangre. Se centrifugaron en dos ocasiones ambos tubos, la primera a 1,200 rpm por 10 minutos y la segunda a 5,000 rpm por 10 minutos, ambas a temperatura ambiente. Posteriormente se recuperó el suero con una pipeta y se transfirieron 700 µl a cada tubo eppendorf de 1.5 ml, previamente rotulados. Se almacenaron a temperatura de -80°C hasta el procesamiento del suero.

Extracción de RNA

Los microRNAs se purificaron a partir 200 µl de suero mediante el kit de suero o plasma miRNeasy (QIAGEN, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Se tomaron 200 µl de suero en un tubo de 1.5 ml, se adicionaron 750 µl de TRIzol LS Reagent y mezclaron con vórtex. Se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente adicionar 200 µl de cloroformo y se mezcló por inversión durante 15 segundos. Se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y se

centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se recuperó la fase acuosa en un tubo de 1.5 ml nuevo (~600 µl). Se adicionaron 1.5 volúmenes de isopropanol al 100% (~900 µl). Se mezclaron los tubos por inversión. Se incubaron a temperatura de -20°C durante 20 minutos. Se agregaron 700 µl a una columna de purificación. Se centrifugaron a 12,500 rpm durante 1 minuto. Se descartó el filtrado. Se repitió los pasos 12 y 13, hasta pasar toda la muestra. Se lavó con 700 µl de buffer RWT, y centrifugó a 12,500 rpm 1 minuto. Se lavó con 500 µl de buffer RPE, y se centrifugó a 12,500 rpm 1 minuto. Se lavó con 500 µl de EtOH 75%, y centrifugó a 12,500 rpm 1 minuto. Se colocaron las columnas en tubos de colección limpios y se centrifugaron durante 3 minutos a 12,500 rpm con la tapa abierta. Se colocaron las columnas en tubos de colección limpios (tubos de 1.5 ml). Se adicionaron 20 µl de H₂O (se precalentó a 42°C) en el centro de la columna. Se incubaron 3 minutos a T.A y se centrifugó a 12,500 rpm. Se cuantificaron en el espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher, Inc.), por lo general, el rendimiento fue de 20-50 ng/µL. Y finalmente, las muestras se almacenaron a temperatura de -70°C.

Perfiles de microRNAs

La cuantificación global de miRNAs en suero, se realizó mediante los arreglos TaqMan de baja densidad v2.0 (TLDA, Applied Biosystems), que incluyen dos cartuchos (A y B). El cartucho A contiene 384 sondas TaqMan de miRNAs permitiendo la cuantificación simultánea de 377 miRNAs maduros humanos y 7 controles endógenos. El cartucho B contiene 290 sondas TaqMan de miRNAs maduros humanos y 7 para controles endógenos.

Las muestras se agruparon por edad de los participantes en individuos menores y mayores de 18 años, con base a la presencia del OS (pacientes y controles). Se incluyeron 5 muestras en cada pool, por lo que se prepararon 4 pools de RNA total: los menores de edad con OS, adultos con OS, menores-control y los adultos-control. Se tomaron 3 µl de RNA de cada pool (Tabla 6), para posteriormente hacer la retrotranscripción (RT, Figura 4). Se hizo la síntesis de cDNA utilizando primers

Megaplex RT de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante (Applied Biosystems) Tabla 7. Las reacciones se mezclaron por inversión y se centrifugaron. Se tomaron 4.5 μ l de cada mezcla (A y B) en 4 tubos para PCR (8 tubos en total) y finalmente se agregaron 3 μ l de RNA (30ng).

Tabla 6. Estratificación de las muestras de acuerdo con la edad de los participantes, en menores y mayores de 18 años, para la formación de los pools.

Pool controles Menores	RNA (ng/μl)	Vol. para 100ng
COS-6	18.1	5.5
COS-10	22.8	4.4
COS-14	12.1	8.3
COS-18	16.7	6.0
COS-19	17.9	5.6
Vol. total de RNA		29.7
Vol. de H₂O para 10ng/μl		20.3

Pool controles Mayores	RNA (ng/μl)	Vol. para 100ng
COS-4	14.8	6.8
COS-8	13.13	7.6
COS-11	13.5	7.4
COS-12	18.4	5.4
COS-16	11.7	8.5
Vol. total de RNA		35.8
Vol. de H₂O para 10ng/μl		14.2

Pool OS menores	RNA (ng/μl)	Vol. para 100ng
OS-6	17	5.9
OS-10	15.6	6.4
OS-14	9.1	11.0
OS-18	13.6	7.4
OS-19	15.7	6.4
Vol. total de RNA		37.0
Vol. de H₂O para 10ng/μl		13.0

Pool OS mayores	RNA (ng/μl)	Vol. para 100ng
OS-4	17.2	5.8
OS-8	41.7	2.4
OS-11	33.4	3.0
OS-12	37.4	2.7
OS-16	18.8	5.3
Vol. total de RNA		19.2
Vol. de H₂O para 10ng/μl		30.8

Tabla 7. Componentes de la transcripción reversa de acuerdo con el protocolo de Applied Biosystems.

Componentes para la reacción de RT Mix	Volumen para una muestra (µL)	Volumen para 4.5 muestras (µL)
Megaplex™ RT Primers (10X)	0.8	3.6
dNTPs con dTTP (100 mM)	0.2	0.9
MultiScribe™ Transcriptasa Reversa (50 U/µL)	1.5	6.75
10X Buffer RT	0.8	3.6
MgCl ₂ (25 mM)	0.9	4.05
Inhibidor de RNasa (20 U/µL)	0.1	0.45
Agua libre de nucleasa	0.2	0.9
	4.5	20.25

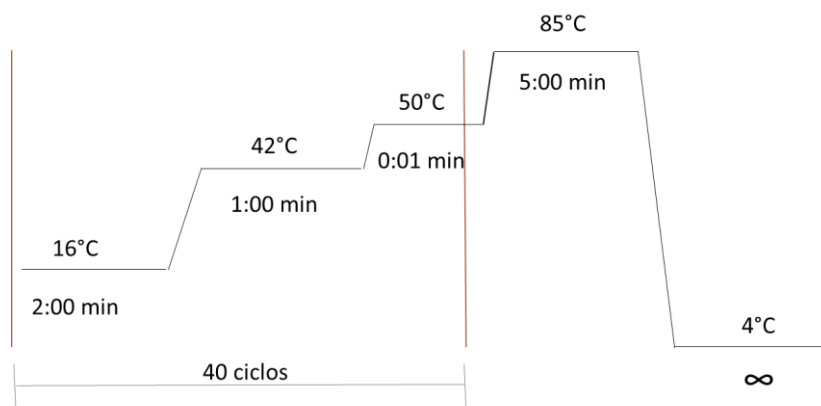


Figura 4. Fases de la transcripción reversa (RT), según las indicaciones del fabricante.

Posteriormente, los productos de RT Megaplex fueron pre-amplificados usando primers PreAmp Megaplex y el Master Mix preamplificador TaqMan (Applied Biosystems). Las cantidades utilizadas se muestran en la tabla 8. Las reacciones se mezclaron por inversión y se centrifugaron, se tomaron 22.5 μ l de cada mezcla (A y B) en 4 tubos para PCR (8 tubos en total). Se agregaron 2.5 μ l del producto de RT y se agregaron 75 μ l de agua a cada tubo. Las condiciones del ciclo de pre-amplificación esta descritos en la Figura 5. El resto de las reacciones se almacenaron a -20° C.

Tabla 8. Componentes de la Pre-Amplificación de acuerdo con el protocolo de Applied Biosystems.

Componentes para la reacción de PreAmp Mix	Volumen para una muestra (μl)	Volumen para 4.5 muestras (μl)
TaqMan® PreAmp Master Mix (2 \times)	12.5	56.25
Megaplex™ PreAmp Primers (10 \times)	2.5	11.25
Nuclease-free water	7.5	33.75
Total	22.5	101.25

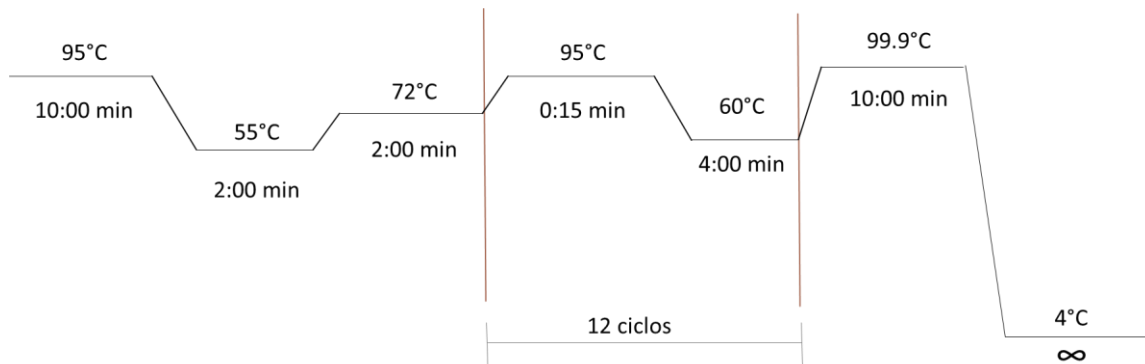


Figura 5. Fases de la pre-amplificación, de acuerdo las indicaciones del fabricante.

El cDNA pre-amplificado fue diluido con agua destilada en una proporción 1:8, se distribuyó en los 384 pozos por centrifugación según instrucciones del fabricante (Tabla 9). Los parámetros de la qPCR fueron 95 °C durante 10 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 15 s y a 60 °C durante 1 minuto. Los TLDA se realizaron en un QuantStudio 7 (Applied Biosystems). Sólo los miRNAs con un valor de Ct menor a 35 fueron considerados para el análisis de expresión. Se calculó las veces de cambio (FC, fold change) mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Se utilizó el valor de la expresión media global de todos los miRNAs como el factor de normalización ⁵⁴.

El $-2^{\Delta\Delta C_t}$ se calcula de la siguiente forma:

$$\Delta C_t (\text{muestra OS}) = C_t (\text{gen de interés, muestra OS}) - C_t (\text{gen de referencia, muestra OS})$$

$$\Delta C_t (\text{control}) = C_t (\text{gen de interés, muestra control}) - C_t (\text{gen de referencia, muestra control})$$

$$\Delta\Delta C_t = C_t (\text{muestra OS}) - C_t (\text{muestra control})$$

Tabla 9. Componentes de las reacciones para los TLDA, de acuerdo con el protocolo de Applied Biosystems.

Componentes	Volumen para un TLDA (μl) ‡
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG, 2X	450
Producto de cDNA pre-amplificado diluido	9
Agua libre de nucleasa	441
Total	900

‡ Incluir un volumen del 12.5% extra por los errores al pipetear.

Validación de microRNAs por RT-qPCR.

Se utilizaron 3 µl de RNA como templado para la transcripción reversa usando el kit de MicroRNA transcripción reversa de microRNAs mediante TaqMan (Applied Biosystems). Posteriormente, cada reacción de transcripción fue diluida a 100 µl con agua libre de RNAasa. Se usaron 5 µl de cada reacción ya diluida para la validación de los miRNAs mediante qPCR utilizando ensayos TaqMan específicos para cada miRNA (miR-215-5p, miR-320a, miR-376c-3p, miR-642a-5p, miR-99b-5p y miR-655-3p) en todos los integrantes de cada grupo (Tabla 10). Las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado en QuantStudio 7 Flex (Applied Biosystems). Se normalizaron usando RNAU6. La expresión relativa de los miRNAs de cada muestra fue determinada mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabla 10. Sondas TaqMan usadas para la validación de miRNAs diferencialmente expresados en los TLDAs.

Sondas de miRNAs solicitadas	No. De catalogo (Applied Biosystems)
hsa-miR-99b-5p	000436
hsa-miR-215-5p	000518
hsa-miR-320a	002277
hsa-miR-376c-3p	002122
hsa-miR-642a-5p	001592
hsa-miR-655-3p	001612

Estadística

En el caso de los TLDAs, la expresión diferencial miRNAs entre los grupos estudiados fue evaluada mediante la prueba de t de student utilizando el software Expression Suite v1.0.3 (Life Technologies). Aquellos miRNAs con un valor de p

<0.05 y una razón de cambio de ± 1.5 se consideraron como diferencialmente expresados.

Para el análisis de la validación (RT-qPCR) se analizaron las muestras mediante la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes, para comparar las razones de cambio de las muestras de los individuos con osteosarcoma en comparación con los individuos sanos. Los valores extremos de cada miRNA fueron detectados y eliminados mediante la prueba ROUT usando el software GraphPad Prism 7.

Predicción de blancos y análisis de enriquecimiento de los genes.

El análisis de genes blanco y vías celulares se realizó en el software miRSystem (<http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/>)⁵⁵. Este incluye siete algoritmos para predecir los blancos de los miRNAs: DIANA-microT, miRanda, mirBridge, PicTar, PITA, rna22 y TargetScan; e incluye dos bases de datos experimentales validadas: TarBase y miRecords. Se incluyó en el análisis los genes blancos que fueron predichos al menos por 3 bases de datos. Para obtener las funciones biológicas y las vías canónicas de los genes blancos, se usó la base de datos miRNet (<http://www.mirnet.ca/>)⁵⁶, la cual utiliza los algoritmos de las bases de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) y Reactome. Para el análisis se seleccionaron las vías metabólicas con un valor de p significativo (≤ 0.001).

Resultados

Datos clínicos

Se recolectaron 15 muestras de suero de individuos con osteosarcoma, las cuales fueron pareadas por edad y sexo con el suero de 15 individuos sanos. Fueron 9 hombres y 6 mujeres con osteosarcoma, con una relación hombre-mujer de 1.5:1. De acuerdo con el lugar de origen, dos pacientes provenían del norte, siete del centro, cinco del este y uno del sur de México. El rango de edad fue de 10 a 36 años, la media de edad fue de 20 años. El síntoma más frecuente fue el dolor (93.3%), algunos pacientes lo relacionaban con el antecedente de traumatismo previo al diagnóstico. Algunos pacientes describieron el dolor como urente e intermitente (33.3%). La localización más común fue el fémur distal (53.3%), seguido de la tibia proximal (13.3%), siendo el lado derecho el más afectado. De acuerdo con la clasificación de Ennking, dos pacientes estuvieron en el estadio IIA, dos en el IIB and el resto en la etapa III. La limitación en el movimiento de las articulaciones se observó en 12 pacientes (80%) y solo dos presentaron fracturas patológicas (13.3%). Referente a la histología del osteosarcoma, la variedad osteoblástica se encontró en seis pacientes, en tres de ellos se observó otro componente además del osteoblástico. Los datos clínicos se resumen en la Tabla 11 y Tabla supl. 1.

Tabla 11. Características clínicas de los pacientes con osteosarcoma.

Variable	Osteosarcoma (n=15)	
	No.	%
Edad (años)		
< 18	8	53.3
> 18	7	46.7
Sexo		
Hombres	9	60
Mujeres	6	40
Localización		
Fémur distal	8	53.3
Fémur distal y tibia proximal	1	6.7
Tibia proximal	2	13.3
Tibia distal	1	6.7
Húmero proximal	2	13.3
Peroné	1	6.7
Subtipo de OS		
Osteoblástico	3	20
Osteoblástico mixto	3	20
Otros	9	60
Metástasis		
Si	13	86.7
No	2	13.3

Análisis de expresión de miRNAs

Se obtuvieron quince miRNAs sobreexpresados con un valor de $p < 0.05$ (Tabla 12) y ninguno infraexpresado. Los microRNAs con expresión diferencial se resumen en la Figura 6. Se realizó un análisis *in silico* usando miRSystem para encontrar los genes blanco relacionados con el ciclo celular de los miRNAs con expresión diferencial (Tabla supl. 2). Con base en los genes blanco, se seleccionaron seis miRNAs, para validación de manera individual en todos los participantes mediante ensayos TaqMan específicos. Estos fueron miR-99b-5p, miR-215-5p, miR-320a, miR-376c-3p, miR-642a-5p y miR-655-3p.

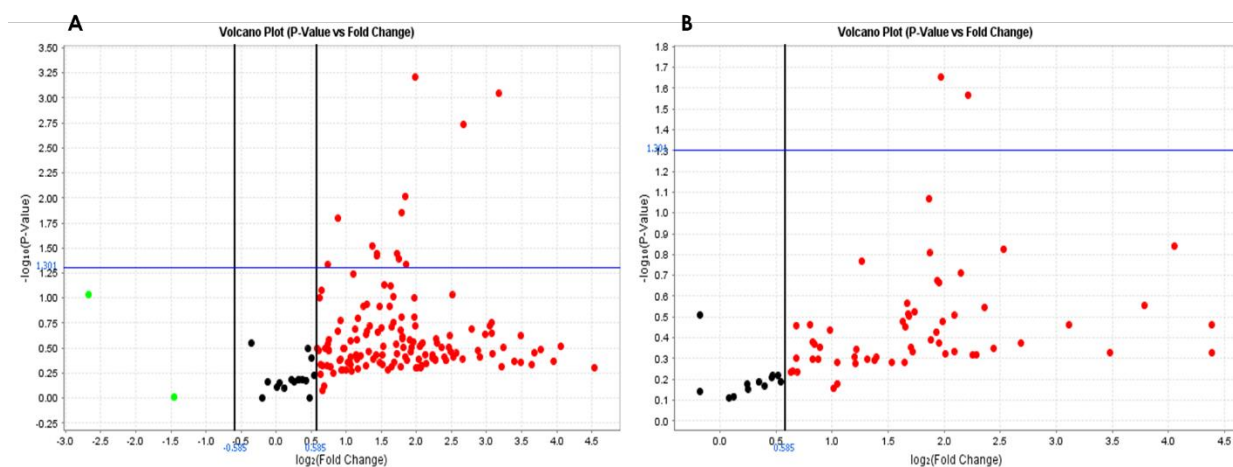


Figura 6. Gráfica de volcán del análisis mediante TLDA de sueros de pacientes con osteosarcoma e individuos sanos. Se analizaron 384 y 290 miRNAs diferentes en el cartucho A y B respectivamente.

Tabla 12. Expresión diferencial de miRNAs de muestras de suero mediante arreglos de baja densidad (TLDA). Se muestran los miRNAs con un valor de p estadísticamente significativo y su razón de cambio en muestras de suero individuos con osteosarcoma.

Expresión diferencial de miRNAs	Valor de p	Razón de cambio
hsa-miR-99b-5p	0.03	2.5
hsa-miR-126-3p	0.036	2.6
hsa-miR-150-5p	0.016	1.8
hsa-miR-215-5p	0.04	3.3
hsa-miR-224-5p	0.002	6.3
hsa-miR-320a	0.046	3.6
hsa-miR-324-5p	0.01	3.58
hsa-miR-376c-3p	0.001	9.0
hsa-miR-454-3p	0.001	3.9
hsa-miR-576-3p	0.038	2.6
hsa-miR-584-5p	0.022	3.9
hsa-miR-628-5p	0.036	3.3
hsa-miR-642a-5p	0.014	3.4
hsa-miR-655-3p	0.047	1.6
hsa-miR-720	0.027	4.6

Validación de los miRNAs mediante RT-qPCR.

Se validaron dos miRNAs diferencialmente sobreexpresados, miR-215 y miR-642, con valores de p de 0.0051 and 0.0229, respectivamente. Mientras que los miR-320a, miR-99b-5p, miR-376c-3p y miR-655-3p no presentaron un valor de p significativo (0.0592, 0.1139, 0.7984, >0.9999), a pesar de que muestran una tendencia a la sobreexpresión en las muestras de osteosarcoma (Figura 7).

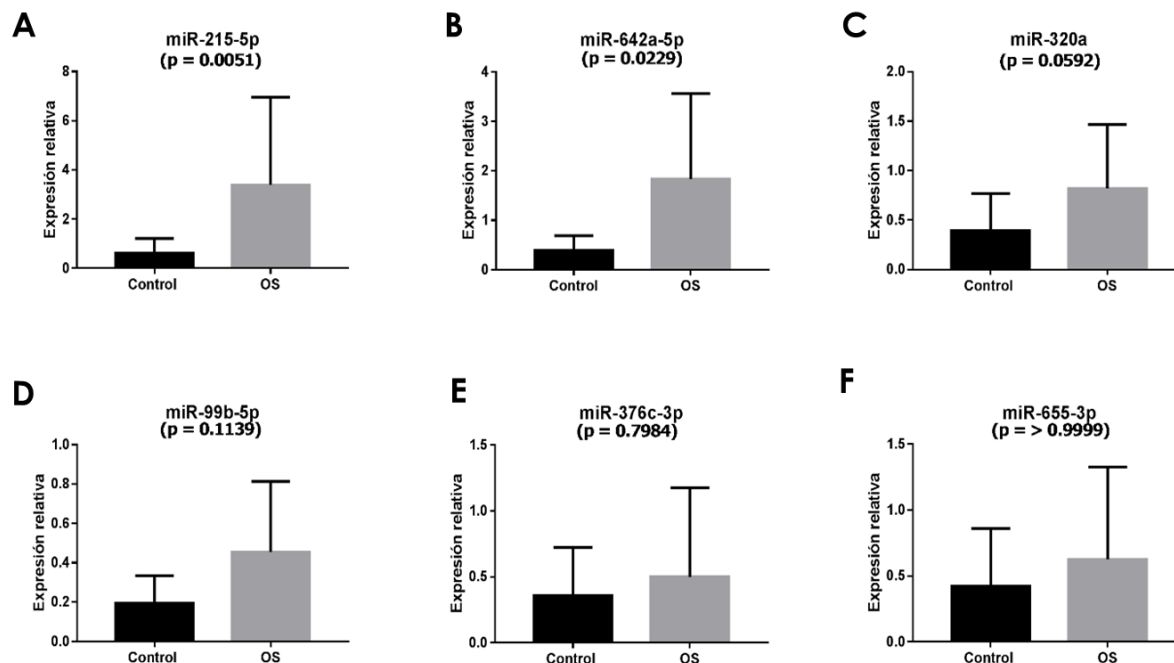


Figura 7. Expresión relativa de los seis miRNAs seleccionados para validación mediante ensayos TaqMan en todos los individuos. La expresión diferencial de **A:** miR-215-5p, **B:** miR-642-5p fueron validados mientras que **C:** miR-320a, **D:** miR-99b-5p, **E:** mir-376c-3p y **F:** miR-655-3p no mostraron una expresión diferencial estadísticamente significativa después de la validación.

Análisis de enriquecimiento

Se construyó un modelo de interacción de genes y vías metabólicas relacionadas con los seis miRNAs que mostraron una expresión diferencial en los TLDAs usando miRNet (Figura 8). En la interacción de los miR-215-5p, miR-642-5p, miR-320a, miR-99b-5p, miR-376c y miR-655-3p, encontramos 21 vías con un valor de $p < 0.05$. Se representan las vías que estaban relacionadas con cáncer como la vía de regulación de pluripotencialidad de las células madres, ciclo celular, cáncer colorectal, desregulación transcripcional en cáncer, vía en cáncer, vía de señalización de p53, vía de señalización de Wnt (Tabla 13) (<http://www.mirnet.ca>)

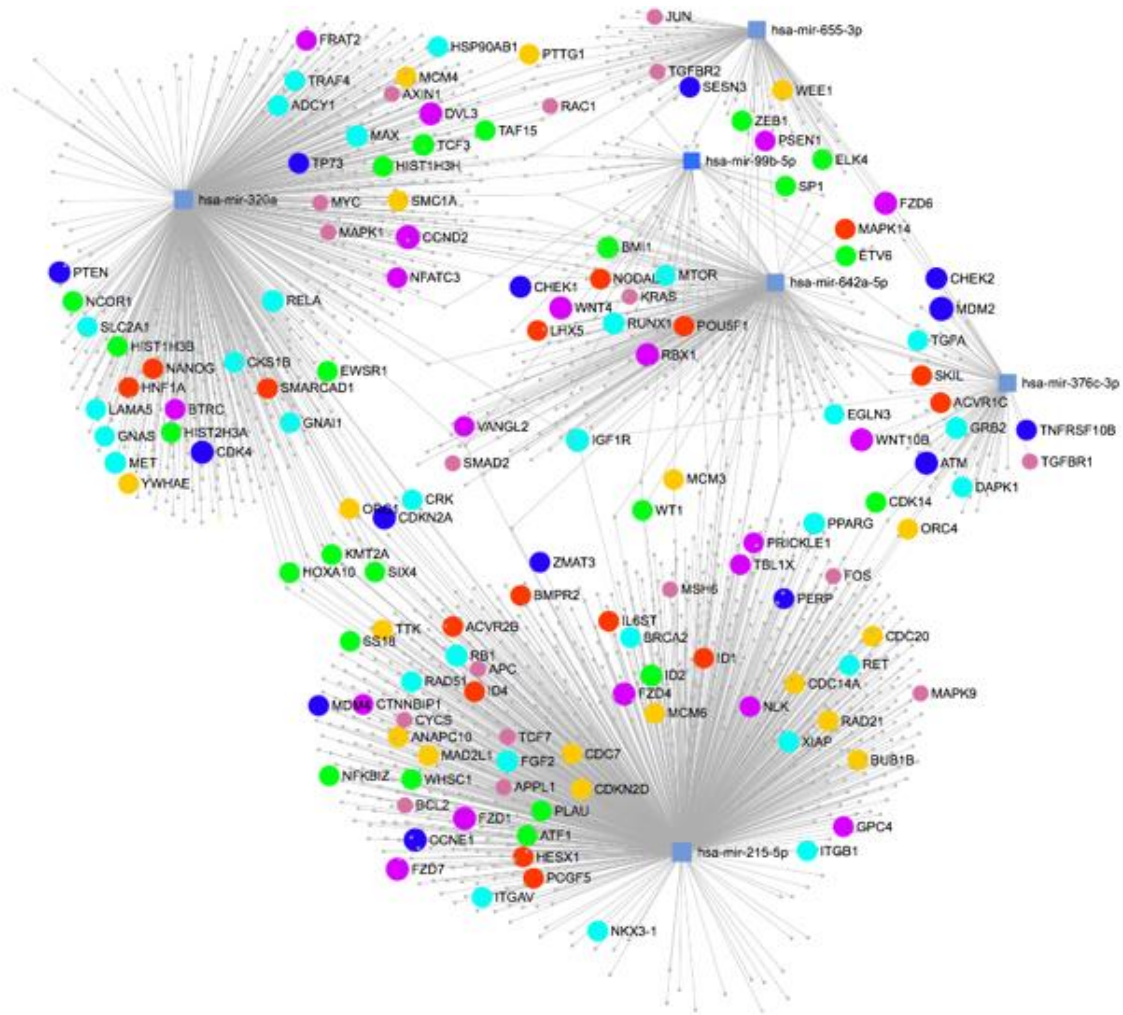


Figura 8. Se muestra la interacción de los blancos de las vías de señalización donde participan los 6 miRNAs diferencialmente expresados en los ensayos TLDA en suero de pacientes con osteosarcoma. Vía de regulación pluripotencialidad (rojo), ciclo celular (naranja), cáncer colorectal (magenta), desregulación transcripcional en cáncer (verde), vía en cáncer (azul aqua), vía de señalización de p53 (azul), vía de señalización de Wnt (violeta).

Tabla 13. Vías metabólicas con un valor de $p < 0.05$ en el análisis de interacción de los seis miRNAs validados por qPCR.

Vías metabólicas	Valor de p
Vía de regulación pluripotencialidad de las células madres	0.0000142
Ciclo celular	0.0000752
Infección de HTLV-I	0.0000752
Proteoglicanos en cáncer	0.0000897
Vía de señalización de neurotrofina	0.00159
Cáncer colorrectal	0.00159
Desregulación transcripcional en cáncer	0.00162
Vía en cáncer	0.00601
Shigellosis	0.00723
Uniones adherentes	0.00857
Vía de señalización de p53	0.00956
Vía de señalización de Hippo	0.00956
Vía de señalización de Wnt	0.0112
Pertusis	0.0254
Meiosis del ovocito	0.0263
Vía de señalización de hormonas tiroideas	0.0407
Carcinoma de células renales	0.0407
Cáncer pancreático	0.0407
Leucemia mieloide crónica	0.0407
Proteínas de procesamiento en el retículo endoplasmático	0.0498
Cáncer de vejiga	0.0498

Discusión

El osteosarcoma es la neoplasia maligna de hueso más común. Actualmente el tratamiento se basa en la quimioterapia y en el procedimiento quirúrgico. Sin embargo, la tasa de supervivencia no ha mejorado en los últimos 20 años. Una de las principales razones, es la falta de biomarcadores con métodos no invasivos que permitan hacer un diagnóstico oportuno. Recientemente, los miRNAs han sido investigados como biomarcadores en diversas enfermedades, convirtiéndolos en candidatos ideales, debido a que están presentes en diversos fluidos corporales. En este trabajo, se presentan las características clínicas y los perfiles de expresión de 15 individuos mexicanos con osteosarcoma. De acuerdo con la clasificación de Enneking, el 73.3% de los pacientes fueron clasificados en el estadio III, esto debido a la ausencia de un diagnóstico oportuno.

A partir de los perfiles de expresión de miRNAs de los pools de sueros de pacientes, se identificaron 15 diferencialmente expresados. Posteriormente a la validación en cada individuo mediante RT-qPCR, se confirmó que los miR-215 y miR-642 estaban sobreexpresados en individuos con OS en comparación con sujetos controles. A pesar de que los miRNAs miR-320, miR-99b-5p, miR-376c-3p y miR-655-3p no alcanzaron un valor de p estadísticamente significativo, se observa una tendencia a la sobreexpresión en individuos afectados.

Los dos miRNAs con valor de p significativo previamente mencionados, habían sido reportados como importantes participantes en diferentes tipos de cáncer. Datos experimentales previos, han encontrado que miR-215 está sobreexpresado en diferentes tipos de cáncer como el cáncer gástrico y glioma. En esos tumores, miR-215 promueve la progresión a través de la unión al 3'UTR de *RB1*^{57,58}. *RB1* es uno de los genes constantemente mutados en el osteosarcoma⁵⁹. Los estudios en líneas

celulares derivadas de osteosarcoma y cáncer de colon han demostrado que la sobreexpresión de miR-215 se asocia con resistencia a quimioterapia, especialmente metotrexato. Este efecto, parece estar relacionado con la reducción de la tasa de proliferación celular debido a la detención del ciclo celular⁶⁰. Trabajos previos han demostrado que las células madre de cáncer que proliferan lentamente son más resistentes a los fármacos quimioterapéuticos⁶⁰. Los pacientes presentados aquí fueron tratados con un esquema multidroga que siempre incluía metotrexato. La evaluación clínica después de la quimioterapia reveló una respuesta deficiente en todos los pacientes. miR-215 podría ser un recurso muy útil para planificar la quimioterapia en pacientes con cáncer. Hasta la fecha, con respecto a los biomarcadores de cáncer, los niveles séricos de miR-215 sólo se han propuesto como biomarcador potencial para el carcinoma hepatocelular⁶¹. Sus blancos y funciones conocidos lo convierten en un candidato atractivo para futuras investigaciones.

De igual forma, identificamos la sobreexpresión de miR-642. La expresión a la baja de este miRNA ha sido reportada en tejido de cáncer de vejiga. La regulación a la baja de miR-642 en líneas celulares de cáncer de vejiga resultó en viabilidad celular disminuida. Las muestras clínicas de pacientes con cáncer gástrico mostraron sobreexpresión de miR-642, apoyando el potencial oncogénico de este miRNA⁶². Trabajos previos con líneas celulares de cáncer de ovario identificaron que la sobreexpresión de miR-642, que se relacionaba con resistencia a cisplatino. Interesantemente, algunos de los genes blancos propuestos para miR-642 también están involucrados en las vías de señalización de MAPK y TGF-beta⁶³.

Además, encontramos que el miR-320 en el suero de nuestros pacientes mostró un valor de p de 0.0592. Este valor muestra una clara tendencia a una expresión diferencial. Lo consideramos importante debido a que muchos de sus genes blanco se han reportado relacionados a vías de cáncer. miR-320 ha sido descrito como un miRNA supresor de tumores, principalmente en osteosarcoma⁶⁴. Los análisis de expresión en tejidos como cáncer de mama, cáncer de colon y leucemia mieloide aguda han mostrado una regulación a la baja de miR-320 comparado con muestras

controles.⁶⁵⁻⁶⁷ Este miRNA, es capaz de suprimir la proliferación celular a través del receptor 1 de la transferrina (*TFRC*) en células humanas de leucemia⁶⁵. Por el contrario, en muestras de cáncer de ovario, fue uno de los principales miRNAs sobreexpresados. Además, la sobreexpresión de miR-320 parece correlacionarse con mal pronóstico y alto riesgo de metástasis. El análisis bioinformático sugiere que los objetivos de miR-320 pueden estar implicados en la vía de señalización MAPK, vía de señalización TGF-beta y vía de señalización de neutropina⁶⁸. Los análisis de expresión de miR-320a en diferentes líneas celulares de osteosarcoma, se observó una disminución estadísticamente significativa en dos de cuatro líneas celulares, donde la sobreexpresión de miR-320 se relacionó con la inhibición del crecimiento celular. Estos investigadores propusieron que la disminución de la proliferación celular se produce por la orientación de *E2F1*⁶⁴. Muy pocos estudios han analizado la expresión de miRNAs en suero de pacientes con osteosarcoma. Lian F *et al*, encontraron sobreexpresión de miR-320 en suero de pacientes antes del tratamiento. De manera interesante, la sobreexpresión disminuía después de la resección del tumor. Además, miR-320 podría ser útil para discriminar entre osteosarcomas con componente osteoblástico de aquellos con componente condroblástico⁶⁹. Este hallazgo apoya la posibilidad de que miR-320 podría ser un potencial biomarcador para el osteosarcoma. Sin embargo, se debe que considerar que la mayoría de estos pacientes desarrollaron metástasis y la mitad de ellos tenían recaída. Se necesitan más investigaciones para buscar una posible relación entre miR-320 y el pronóstico, como se ha sugerido en pacientes con cáncer de ovario.

Los miR-655-3p, miR-376c-3p y miR-99b-5p mostraron una tendencia a la sobreexpresión en este estudio, sin embargo, su valor de p estuvo lejos de la significancia estadística. Hay pocos reportes acerca de miR-655-3p y su participación en la biología del cáncer. miR-655-3p ha sido estudiado en el carcinoma hepatocelular (HCC). Este miRNA ha mostrado una expresión a la baja en tejido del carcinoma hepatocelular carcinoma. Estudios funcionales sugieren que la sobreexpresión del miR-655-3p podría estar relacionada con la disminución de la

proliferación celular, migración e invasión en el HCC. Esta función como supresor de tumor ha sido directamente relacionada con ADAM10 e indirectamente con la vía de β -catenina⁷⁰. El nivel de expresión de miR-655-3p ha presentado una correlación estadísticamente significativa con las características clínicas del HCC (invasión microvascular, estadio tumoral y metástasis a ganglios). También se ha relacionado que los pacientes que tuvieron una menor supervivencia fueron quienes presentaron una expresión alta de miR-655-3p⁷¹. Así mismo, miR-655-3p se ha encontrado expresado a la baja en el carcinoma epidermoide de esófago (ESCC)⁷², y el cáncer de mama triple negativo (TNBC). La expresión a la baja de miR-655-3p ha sido relacionada con metástasis a ganglios linfáticos y es usada para la clasificación molecular en los TNBC ⁷³.

miR-99b-5p ha sido descrito en osteosarcoma⁷⁴, encontrándose sobreexpresado en individuos que tiene buena respuesta a la ifosfamida ⁵³. De forma similar, los niveles altos de miR-99b-5p se ha relacionado con una mejor supervivencia de pacientes con cáncer colorectal⁷⁵. Se ha asociado la sobreexpresión de miR-99b-5p, let-7e y miR-125a con los estadios avanzados del ESCC. Este grupo conformado por miR-99b-5p/let-7e/miR-125a, son regulados por ZEB1, el cual es un activador de la transición epitelial a mesénquima en varios tipos de cáncer. La expresión de este grupo de miRNAs, mediado por ZEB1, regula a la baja la expresión de ARID3A. ARID3A es indispensable para la migración celular e invasión en el ESCC inducido por grupo miR-99b-5p/let-7e/miR-125a⁷⁶. Existen reportes previos de miR-99b-5p donde su expresión se ha visto desregulada en otros tipos de cáncer como gliomas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas y cáncer de endometrio⁷⁷.

La sobreexpresión de miR-376c-3p disminuye la proliferación, suprime la viabilidad, migración e invasión celular, además de inducir el arresto en G1/G0 y la apoptosis en líneas celulares de cáncer escamoso de cavidad oral mediante *HOXB7*⁷⁸. En el adenocarcinoma gástrico promueve la apoptosis celular *in vitro* e inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* ⁷⁹. La sobreexpresión de estos miRNAs promueve la

viabilidad celular y limita la apoptosis en el cáncer colorectal, posiblemente debido a la modulación de la expresión de *Ki-67*, *Bcl-2*, *Fas* y el efecto supresor de *LINC00152* (RNAs largos no codificantes)⁸⁰.

Conclusiones

En nuestro estudio, se identificó un perfil de sobreexpresión de los miRNAs en los sueros de individuos con osteosarcoma, donde miR-215-5p y miR-642-5p fueron estadísticamente significativos ($p = 0.0051$ y 0.0229 , respectivamente). Es importante mencionar que de estos dos miRNAs, solo miR-215-5p se ha relacionado previamente en el osteosarcoma. Otros microRNAs sobreexpresados que tuvieron un valor de p no significativo, fueron miR-320a y, miR-99b-5p ($p = 0.0592$ y 0.1139 respectivamente) han sido reportados previamente en esta neoplasia. Relacionándose miR-215-5p con la resistencia de metotrexato, miR-320a con la presencia del tumor y la diferenciación de osteosarcoma osteoblástico del condroblástico y miR-99b-5p con una buena respuesta al tratamiento con ifosfamida. Sin embargo, también encontramos sobreexpresados a miR-642-5p, miR-376c-3p ($p = 0.7984$) y miR-655-3p ($p = >0.9999$), los cuales han sido relacionados en la progresión, metástasis y resistencia a la quimioterapia en otros tumores.

Los mecanismos que regulan el comportamiento biológico de los tumores aún no han sido completamente dilucidados. El análisis de expresión de miRNAs es una poderosa herramienta para identificar genes y vías metabólicas involucradas en la progresión de los tumores. Los genes y vías metabólicas relacionados con estos 6 miRNAs, se han relacionado con ciclo celular, desregulación transcripcional en cáncer, vía en cáncer, vía de señalización de p53, contribuyen con el conocimiento del osteosarcoma. Sin embargo, es necesario validar los genes blancos y diseñar estudios funcionales para encontrar blancos moleculares útiles en el tratamiento del osteosarcoma a fin de mejorar la sobrevida de los pacientes.

Expectativas

Este estudio junto con los previamente realizados en osteosarcoma, darán la base para que los miRNAs identificados, sirvan como nuevos biomarcadores de osteosarcoma, lo que permitiría reducir el retraso en el diagnóstico, así como dar un tratamiento oportuno y personalizado a cada paciente con el fin de mejorar la supervivencia y calidad de vida de estos individuos.

Referencias

1. Hogendoorn PCW, Athanasou N, Bielack S, Al. E. Bone sarcomas: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2010;21(SUPPL. 5):204-213. doi:10.1093/annonc/mdq223.
2. Morrow JJ, Khanna C. Osteosarcoma Genetics and Epigenetics: Emerging Biology and Candidate Therapies. *Crit Rev Oncog.* 2015;20(3-4):173-197. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq223>.
3. Juárez-Ocaña S, González-Miranda G, Mejía-Aranguré JM, Al E. Frequency of cancer in children residing in Mexico City and treated in the hospitals of the Instituto Mexicano del Seguro Social (1996-2001). *BMC Cancer.* 2004;4:50. doi:10.1186/1471-2407-4-50.
4. Rodríguez-Franco JH, Técualt-Gómez R, Amaya-zepeda RA, Atencio-Chan A, Cario-Méndez AG, González-Valladares R. Comportamiento epidemiológico del osteosarcoma en la población mexicana entre 2005 y 2014. *Rev Asoc Argent Ortop Traumatol.* 2016;81(3):219-226. <http://dx.doi.org/10.15417/542>.
5. Baena-Ocampo L del C, Ramirez-Perez E, Linares-Gonzalez LM, Delgado-Chavez R. Epidemiology of bone tumors in Mexico City: retrospective clinicopathologic study of 566 patients at a referral institution. *Ann Diagn Pathol.* 2009;13(1):16-21. doi:10.1016/j.anndiagpath.2008.07.005.
6. Shalkow, Jaime. Ketrín, Sofía. Palomares, Gabriela. Esparza M. *Comportamiento Epidemiológico Del Cáncer En Menores de 18 Años. México 2008-2014.* Mexico; 2014. http://www.censia.salud.gob.mx/contenidos/descargas/cancer/20160601_Bol etin-2014_SEDP12sep16_4.pdf.
7. Shalkow-Klincovstein J, Neme-Meunuer SK, Castro-Ceronio LE, Esparza-

Aguilar M, Carrillo-Torres RM. *Boletín de Información de Cáncer En Niñas (Os) Y Adolescentes Con Cáncer 2008-2012*. Mexico; 2012.

<http://censia.salud.gob.mx/contenidos/descargas/cancer/BoletinNacionalCancer2014.pdf>.

8. Muscolo DL, Farfalli GL, Tinao LA, Ayerza MA. Actualización en osteosarcoma. *Rev Asoc Argent Ortop Traumatol*. 2009;74(1):85-101. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1852-74342009000100015&script=sci_arttext&tlng=en.
9. Geller DS, Gorlick R. Osteosarcoma: A Review of Diagnosis, Management, and Treatment Strategies. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2010;8(10):705-718. doi:10.1037/0278-7393.16.2.305.
10. Mai, Phuong L, Malkin D, Garber JE, et al. Li-Fraumeni syndrome: report of a clinical research workshop and creation of a research consortium. *Cancer Genet*. 2012;205(10):479-487. doi:10.1016/j.cancergen.2012.06.008.Li-Fraumeni.
11. Muftuoglu M, Oshima J, von Kobbe C, Cheng W-H, Leistriz DF BV. The clinical characteristics of Werner syndrome: molecular and biochemical diagnosis. *Hum Genet*. 2008;124(4):369–377. doi:10.1007/s00439-008-0562-0.
12. Larizza L, Roversi G, Volpi L. Rothmund-Thomson syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5(2):1-16. doi:10.1186/1750-1172-5-2.
13. Cunniff C, Bassetti JA, Ellis NA. Bloom's syndrome: Clinical Spectrum, Molecular Pathogenesis, and Cancer Predisposition. *Mol Syndromol*. 2017;8(1):4-23. doi:10.1159/000452082.
14. Kooi IE, Mol BM, Massink MPG, et al. A meta-analysis of retinoblastoma copy numbers refines the list of possible driver genes involved in tumor progression. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153323. doi:10.1371/journal.pone.0153323.
15. Saeter G. ESMO minimum clinical recommendations for diagnosis, treatment

and follow-up of osteosarcoma. *Ann Oncol*. 2003;14(8):1165-1166.
doi:10.1093/annonc/mdg336.

16. Thorpe WP, Reilly JJ, Rosenberg SA. Prognostic significance of alkaline phosphatase measurements in patients with osteogenic sarcoma receiving chemotherapy. *Cancer*. 1979;43(6):2178-2181. doi:10.1002/1097-0142(197906)43:6<2178::AID-CNCR2820430603>3.0.CO;2-9.
17. Wadhwa N. Osteosarcoma: Diagnostic dilemmas in histopathology and prognostic factors. *Indian J Orthop*. 2014;48(3):247-254. doi:10.4103/0019-5413.132497.
18. Chang L, Shrestha S, LaChaud G, Scott MA, James AW. Review of microRNA in osteosarcoma and chondrosarcoma. *Med Oncol*. 2015;32(6):2-7. doi:10.1007/s12032-015-0613-z.
19. Jawad MU, Scully SP. Classifications in brief: Enneking classification: Benign and malignant tumors of the musculoskeletal system. *Clin Orthop Relat Res*. 2010;468(7):2000-2002. doi:10.1007/s11999-010-1315-7.
20. Huvos AG, Woodard HQ, Cahan WG, et al. Postradiation osteogenic sarcoma of bone and soft tissues. A clinicopathologic study of 66 patients. *Cancer*. 1985;55(6):1244-1255. doi:10.1002/1097-0142(19850315)55:6<1244::AID-CNCR2820550617>3.0.CO;2-1.
21. Rosen G, Marcove RC, Caparros B, Nirenberg A, Kosloff C, Huvos AG. Primary osteogenic sarcoma. The rationale for preoperative chemotherapy and delayed surgery. *Cancer*. 1979;43(6):2163-2177. doi:10.1002/1097-0142(197906)43:6<2163::AID-CNCR2820430602>3.0.CO;2-S.
22. Rosen G, Murphy M, Huvos A, Gutierrez M, Marcove R. Chemotherapy, en bloc resection, and prosthetic bone replacement in the treatment of osteogenic sarcoma. *Cancer*. 1976;37(1):1-11. doi:10.1007/978-1-4471-5451-8_124.
23. Zhang J, Yan YG, Wang C, Zhang SJ, Yu XH, Wang WJ. MicroRNAs in osteosarcoma. *Clin Chim Acta*. 2015;444:9-17.

doi:10.1016/j.cca.2015.01.025.

24. Nair VS, Pritchard CC, Tewari M, Ioannidis JP. Design and Analysis for Studying microRNAs in Human Disease: A Primer on -Omic Technologies. *Am J Epidemiology*. 2014;180(2):140-152. doi:10.1093/aje/kwu135.
25. Armand-Labit V, Pradines A. Circulating cell-free microRNAs as clinical cancer biomarkers. *BioMol Concepts*. 2017;8(2):1-21. doi:10.1515/bmc-2017-0002.
26. Lan H, Lu H, Wang X, Jin H. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: Opportunities and challenges. *Biomed Res Int*. 2015;2015:125094. doi:10.1155/2015/125094.
27. Martinez-Hernandez R, Sampedro-Nunez M, Serrano-Somavilla A, et al. A microRNA signature for evaluation of risk and severity of Autoimmune Thyroid Diseases. *J Clin Endocrinol Metab*. January 2018. doi:10.1210/jc.2017-02318.
28. Williams AEG, Choi K, Chan AL, et al. Sjögren's syndrome-associated microRNAs in CD14+monocytes unveils targeted TGF β signaling. *Arthritis Res Ther*. 2016;18(1):1-13. doi:10.1186/s13075-016-0987-0.
29. Ali SS, Kala C, Abid M, Ahmad N, Sharma US, Khan NA. Pathological microRNAs in acute cardiovascular diseases and microRNA therapeutics. *J Acute Dis*. 2016;5(1):9-15. doi:10.1016/j.joad.2015.08.001.
30. Barwari T, Joshi A, Mayr M. MicroRNAs in Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68(23):2577-2584. doi:10.1016/j.jacc.2016.09.945.
31. Condorelli G, Latronico MVG, Cavarretta E. MicroRNAs in cardiovascular diseases: Current knowledge and the road ahead. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(21):2177-2187. doi:10.1016/j.jacc.2014.01.050.
32. Almas I, Afzal S, Idrees M, et al. Role of circulatory microRNAs in the pathogenesis of hepatitis C virus. *Virusdisease*. 2017;28(4):360-367. doi:10.1007/s13337-017-0407-3.
33. Duy J, Koehler JW, Honko AN, et al. Circulating microRNA profiles of Ebola

- virus infection. *Sci Rep.* 2016;6:1-13. doi:10.1038/srep24496.
34. Liu Y-J, Li W, Chang F, Liu J-N, Lin J-X, Chen D-X. MicroRNA-505 is downregulated in human osteosarcoma and regulates cell proliferation, migration and invasion. *Oncol Rep.* 2018;39(2):491-500. doi:10.3892/or.2017.6142.
 35. Golbakhsh MR, Boddouhi B, Hatami N, et al. Down-regulation of microRNA-182 and microRNA-183 predicts progression of osteosarcoma. *Arch Med Sci.* 2017;13(6):1352-1356. doi:10.5114/aoms.2016.60091.
 36. Yang Z, Wa Q-D, Lu C, Pan W, Lu Z-M, Ao J. miR3283p enhances the radiosensitivity of osteosarcoma and regulates apoptosis and cell viability via H2AX. *Oncol Rep.* 2018;39(2):545-553. doi:10.3892/or.2017.6112.
 37. Ru N, Zhang F, Liang J, et al. MiR-564 is down-regulated in osteosarcoma and inhibits the proliferation of osteosarcoma cells via targeting Akt. *Gene.* 2018;645:163-169. doi:10.1016/j.gene.2017.12.028.
 38. Lin N, Lin Y, Fu X, et al. MicroRNAs as a Novel Class of Diagnostic Biomarkers in Detection of Oral Carcinoma: a Meta-Analysis Study. *Clin Lab.* 2016;62(3):451-461.
 39. Zhou G, Shi X, Zhang J, Wu S, Zhao J. MicroRNAs in osteosarcoma: From biological players to clinical contributors, a review. *J Int Med Res.* 2013;41:1-12. doi:10.1177/0300060513475959.
 40. Zhang H, Cai X, Wang Y, Tang H, Tong D, Ji F. microRNA-143, down-regulated in osteosarcoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity by targeting Bcl-2. *Oncol Rep.* 2010;24(5):1363-1369.
 41. Ziyang W, Shuhua Y, Xiufang W, Xiaoyun L. MicroRNA-21 is involved in osteosarcoma cell invasion and migration. *Med Oncol.* 2011;28(4):1469-1474. doi:10.1007/s12032-010-9563-7.
 42. Liu L, Li H, Li J, et al. miR-125b suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma cells through down-regulation of STAT3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;416(1-2):31-38. doi:10.1016/j.bbrc.2011.10.117.

43. Jones KB, Salah Z, Del Mare S, et al. miRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma. *Cancer Res.* 2012;72(7):1865-1877. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2663.
44. Thayanithy V, Sarver AL, Kartha R V, et al. Perturbation of 14q32 miRNAs-cMYC gene network in osteosarcoma. *Bone.* 2012;50(1):171-181. doi:10.1016/j.bone.2011.10.012.
45. Osaki M, Takeshita F, Sugimoto Y, et al. MicroRNA-143 regulates human osteosarcoma metastasis by regulating matrix metalloprotease-13 expression. *Mol Ther.* 2011;19(6):1123-1130. doi:10.1038/mt.2011.53.
46. Huang J, Ni J, Liu K, et al. HMGB1 promotes drug resistance in osteosarcoma. *Cancer Res.* 2012;72(1):230-238. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2001.
47. Montanini L, Lasagna L, Barili V, et al. MicroRNA cloning and sequencing in osteosarcoma cell lines: differential role of miR-93. *Cell Oncol (Dordr).* 2012;35(1):29-41. doi:10.1007/s13402-011-0059-z.
48. Zhang C, Yao C, Li H, Wang G, He X. Serum levels of microRNA-133b and microRNA-206 expression predict prognosis in patients with osteosarcoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(7):4194-4203.
49. Zhang C, Yao C, Li H, Wang G, He X. Combined elevation of microRNA-196a and microRNA-196b in sera predicts unfavorable prognosis in patients with osteosarcomas. *Int J Mol Sci.* 2014;15(4):6544-6555. doi:10.3390/ijms15046544.
50. Ma W, Zhang X, Chai J, Chen P, Ren P, Gong M. Circulating miR-148a is a significant diagnostic and prognostic biomarker for patients with osteosarcoma. *Tumour Biol.* 2014;35(12):12467-12472. doi:10.1007/s13277-014-2565-x.
51. Song B, Wang Y, Xi Y, et al. Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. *Oncogene.* 2009;28(46):4065-4074. doi:10.1038/onc.2009.274.

52. He C, Xiong J, Xu X, et al. Functional elucidation of MiR-34 in osteosarcoma cells and primary tumor samples. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;388(1):35-40. doi:10.1016/j.bbrc.2009.07.101.
53. Gougelet A, Pissaloux D, Besse A, et al. Micro-RNA profiles in osteosarcoma as a predictive tool for ifosfamide response. *Int J Cancer*. 2011;129(3):680-690. doi:10.1002/ijc.25715.
54. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol*. 2009;10(6):R64. doi:10.1186/gb-2009-10-6-r64.
55. Lu T-P, Lee C-Y, Tsai M-H, et al. miRSystem : An Integrated System for Characterizing Enriched Functions and Pathways of MicroRNA Targets. *PLoS One*. 2012;7(8):e42390. doi:10.1371/journal.pone.0042390.
56. Fan Y, Siklenka K, Arora SK, Ribeiro P, Kimmins S, Xia J. miRNet - dissecting miRNA-target interactions and functional associations through network-based visual analysis. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(W1):W135-W141. doi:10.1093/nar/gkw288.
57. Deng Y, Huang Z, Xu Y, et al. MiR-215 modulates gastric cancer cell proliferation by targeting RB1. *Cancer Lett*. 2014;342(1):27-35. doi:10.1016/j.canlet.2013.08.033.
58. Wei Y, Sun J, Li X. MicroRNA-215 enhances invasion and migration by targeting retinoblastoma tumor suppressor gene 1 in high-grade glioma. *Biotechnol Lett*. 2017;39(2):197-205. doi:10.1007/s10529-016-2251-8.
59. Martin JW, Squire JA, Zielenska M. The Genetics of Osteosarcoma. *Sarcoma*. 2012;2012(627254). doi:10.1155/2012/627254.
60. Zou GM. Cancer initiating cells or cancer stem cells in the gastrointestinal tract and liver. *J Cell Physiol*. 2008;217(3):598-604. doi:10.1002/jcp.21541.
61. Zhang Z, Meng H, Wang N, et al. Serum microRNA 143 and microRNA 215 as potential biomarkers for the diagnosis of chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Diagn Pathol*. 2014;9:135. doi:10.1186/1746-1596-

9-135.

62. He J, Hua J, Ding N, et al. Modulation of microRNAs by ionizing radiation in human gastric cancer. *Oncol Rep.* 2014;32(2):787-793. doi:10.3892/or.2014.3246.
63. Kumar S, Kumar A, Shah PP, Rai SN, Panguluri SK, Kakar SS. MicroRNA signature of cis-platin resistant vs. cis-platin sensitive ovarian cancer cell lines. *J Ovarian Res.* 2011;4(17):1-11. doi:10.1186/1757-2215-4-17.
64. Wu H, Li W, Zhang M, Zhu S, Zhang D WX. Inhibitory roles of miR-320 in osteosarcoma via regulating E2F1. *J Can Res Ther.* 2016;12:68-71. doi:10.4103/0973-1482.191635.
65. Schaar DG, Medina DJ, Moore DF, Strair RK, Ting Y. miR-320 targets transferrin receptor 1 (CD71) and inhibits cell proliferation. *Exp Hematol.* 2009;37(2):245-255. doi:10.1016/j.exphem.2008.10.002.
66. Bronisz A, Godlewski J, Wallace JA, et al. Reprogramming of the tumour microenvironment by stromal PTEN-regulated miR-320. *Nat Cell Biol.* 2011;14(2):159-167. doi:10.1038/ncb2396.
67. Khew-Goodall Y, Goodall GJ. Stromal miR-320 keeps an oncogenic secretome in check. *Nat Cell Biol.* 2012;14(2):124-125. doi:10.1038/ncb2431.
68. Wang W, Yang J, Xiang Y, et al. Overexpression of Hsa-miR-320 is associated with invasion and metastasis of ovarian cancer. *J Cell Biochem.* 2017;(11):3654-3661. doi:10.1002/jcb.26009.
69. Lian F, Cui Y, Zhou C, Gao K, Wu L. Identification of a plasma four-microRNA panel as potential noninvasive biomarker for osteosarcoma. *PLoS One.* 2015;10(3):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0121499.
70. Wu G, Zheng K, Xia S, et al. MicroRNA-655-3p functions as a tumor suppressor by regulating ADAM10 and β -catenin pathway in Hepatocellular Carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35(1):89. doi:10.1186/s13046-016-0368-1.

71. Zhao X, Liang B, Jiang K, Zhang H. Down-regulation of miR-655-3p predicts worse clinical outcome in patients suffering from hepatocellular carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(4):748-752.
72. Chang P, Wang X, Zhou Y, Hou Y. Analysis of the correlation between the expression of miR-655 and esophageal cancer prognosis. *Oncol Lett.* 2017;13(6):4691-4694. doi:10.3892/ol.2017.6047.
73. Lv ZD, Kong B, Liu XP, et al. miR-655 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition by targeting Prrx1 in triple-negative breast cancer. *J Cell Mol Med.* 2016;20(5):864-873. doi:10.1111/jcmm.12770.
74. Hu H, Zhang Y, Cai XH, Huang JF, Cai L. Changes in microRNA expression in the MG-63 osteosarcoma cell line compared with osteoblasts. *Oncol Lett.* 2012;4(5):1037-1042. doi:10.3892/ol.2012.866.
75. Vychytilova-Faltejskova P, Pesta M, Radova L, et al. Genome-wide microRNA Expression Profiling in Primary Tumors and Matched Liver Metastasis of Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Genomics Proteomics.* 2016;13(4):311-316.
76. Ma J, Zhan Y, Xu Z, et al. ZEB1 induced miR-99b/let-7e/miR-125a cluster promotes invasion and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2017;398:37-45. doi:10.1016/j.canlet.2017.04.006.
77. Zhang MY, Guo Y, Wu J, et al. Roles of microRNA-99 family in human glioma. *Onco Targets Ther.* 2016;9:3613-3619. doi:10.2147/OTT.S99363.
78. Wang K, Jin J, Ma T, Zhai H. MiR-376c-3p regulates the proliferation, invasion, migration, cell cycle and apoptosis of human oral squamous cancer cells by suppressing HOXB7. *Biomed Pharmacother.* 2017;91:517-525. doi:10.1016/j.biopha.2017.04.050.
79. Tu L, Zhao E, Zhao W, et al. hsa-miR-376c-3p Regulates Gastric Tumor Growth Both In Vitro and In Vivo. *Biomed Res Int.* 2016;2016:9604257. doi:10.1155/2016/9604257.
80. Zhang Y-H, Fu J, Zhang Z-J, Ge C-C, Yi Y. LncRNA-LINC00152 down-

regulated by miR-376c-3p restricts viability and promotes apoptosis of colorectal cancer cells. *Am J Transl Res.* 2016;8(12):5286-5297.

Anexos

Tabla suplementaria 1. Características clínicas de los pacientes con osteosarcoma.

Código	Edad de obtención de muestra	Sexo	Cuadro clínico							Quimioterapia				Reporte de patología	Metástasis
			Edad inicio de síntomas	Anteced de trauma	Aumento de volumen	Dolor	Limitación de articulación	Red venosa	Fx	Neoadyuvante / adyuvante	Fármacos neoadyuvantes	Respuesta de necrosis tumoral	Fármacos adyuvantes		
OS-4	27	M	25	si	si	si	no	no	no	Neoadyuv	desc	desc	desc	OS parosteal	-
OS-6	15	M	14	si	si	si	si	no	no	Neoadyuv / adyuv	cisplatino doxirrubicina	mala	desconoce	OS con componente condroblástico y osteoblástico	pulmón
OS-8	23	M	22	si	si	si	si	no	no	Neoadyuv / adyuv	adriamicina cisplatino doxorubicino y cisplatino	mala	etoposido e ifosfamida, carboplatino	OS fibroblástico, condroblástico y osteoblástico	pulmón
OS-10	16	F	16	no	si	si	si	no	no	Neoadyuv / adyuv	cisplatino doxorubicina	mala	ifosfamida metotexato etoposido	OS fibroblástico, condroblástico y telangiectásico	pulmón
OS-11	20	F	16		si	si	si	no	no	Neoadyuv / adyuv	adriamicina cisplatino	-	ifosfamida etoposido	Osteosarcoma	pulmón
OS-12	28	F	28	no	si	si	si	no	no	Adyuvan	-	buena	cisplatino doxorubicina	OS fibroblástico	pulmón
OS-14	16	M	15	no	si	si	no	no	no	Neoadyuv / adyuv	cisplatino doxorubicina	mala	ifosfamida etoposido	OS condroblástico	pulmón
OS-16	36	M	32	no	si	no	si	si	si	Neoadyuv	ifosfamida etoposido	mala	-	OS telangiectásico	pulmón
OS-18	15	F	14	no	si	si	no	no	no	Neoadyuv / adyuv	cisplatino doxorubicina	mala	ifosfamida etoposido	OS fibroblástico, condroblástico y osteoblástico	Pulm ón
OS-19	17	M	16	si	si	si	si	no	si	Adyuv	-	mala	cisplatino doxorubicina	OS osteoblástico	pulmón/ ganglios axilares
OS-20	16	M	16	no	si	si	si	no	no	Neoadyuv / adyuv	cisplatino doxorubicina	mala	ifosfamida etoposido	OS osteoblástico	-
OS-21	10	M	10	no	si	si	si	si	no	Neoadyuv	cisplatino epirrubicina	mala	-	OS osteoblástico	pulmón
OS-22	24	F	23	no	si	si	si	no	no	Neoadyuv	cisplatino doxorubicina	mala	-	OS telangiectásico	pulmón
OS-23	13	F	12	no	si	si	si	si	no	Neoadyuv	metotrexato cisplatino	mala	-	OS de células pequeñas	-
OS-24	31	M	30	si	si	si	si	no	no	Neoadyuv	ifosfamida y etoposido /	mala	-	OS fibroblástico	pulmón

											cisplatino y doxorubicina				
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	------------------------------	--	--	--	--

Fx. Fracturas

Tabla suplementaria 2. Genes blanco de los miRNAs diferencialmente expresados entre los pacientes e individuos sanos mediante arreglos TaqMan de baja densidad (TLDA). Los genes blancos fueron escogidos en función a su participación en el ciclo celular mediante un análisis *in silico* usando miRSystem.

Genes blancos		
hsa-miR-99b-5p	HS3ST2	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 2
	HS3ST3B1	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3B1
	SMARCA5	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5
	CDC25A	cell division cycle 25A
	ST5	suppression of tumorigenicity 5
	MYCBP	MYC binding protein
	RAP1B	RAP1B, member of RAS oncogene family
	TARDBP	TAR DNA binding protein
	THAP2	THAP domain containing, apoptosis associated protein 2

hsa-miR-126-3p	
Genes blancos	
CRK	v-crk avian sarcoma virus CT10 oncogene homolog
RGS3	regulator of G-protein signaling 3

Genes blancos		
hsa-miR-150-5p	EGR2	early growth response 2
	MYB	v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog
	CACNA1G	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit
	ELK1	ELK1, member of ETS oncogene family
	GTF3C2	general transcription factor IIIc, polypeptide 2, beta 110kDa
	MAP3K12	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12
	AKT3	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3
	CAMK2G	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma
	EBF3	early B-cell factor 3
	HRASLS	HRAS-like suppressor
	NR2F2	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2
	PA2G4	proliferation-associated 2G4, 38kDa
	PDCD4	programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)
	SMARCD1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 1
	SYNGAP1	synaptic Ras GTPase activating protein 1
TSC22D3	TSC22 domain family, member 3	

CBL	Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase
CCND2	cyclin D2
CDC73	cell division cycle 73
E2F3	E2F transcription factor 3
EGR1	early growth response 1
MAP3K11	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11
MAP3K3	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3
MAPK9	mitogen-activated protein kinase 9
MAPKAPK3	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3
PHTF2	putative homeodomain transcription factor 2
SMARCD2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 2
TCF12	transcription factor 12
TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1
CCNE1	cyclin E1

Genes blancos	
DHFR	dihydrofolate reductase
RAB2A	RAB2A, member RAS oncogene family
KHDRBS3	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 3
PHAX	phosphorylated adaptor for RNA export
RB1	retinoblastoma 1
SMARCAD1	SWI/SNF-related, matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a, containing DEAD/H box 1
BLCAP	bladder cancer associated protein
RPRD1B	regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 1B
H3F3B	H3 histone, family 3B (H3.3B)
KIAA1033	KIAA1033
ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule
CADM1	cell adhesion molecule 1
MGEA5	meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)
SCN3A	sodium channel, voltage-gated, type III, alpha subunit
CCNT2	cyclin T2
MAP3K1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1, E3 ubiquitin protein ligase
SOCS6	suppressor of cytokine signaling 6
CDON	cell adhesion associated, oncogene regulated
RICTOR	RPTOR independent companion of MTOR, complex 2

BCL11B	B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein)
CBL	Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase

Genes blancos	
CASC3	cancer susceptibility candidate 3
CBL	Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase
CDC27	cell division cycle 27
MAP3K7	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
CDC42	cell division cycle 42
CDK6	cyclin-dependent kinase 6
CDK9	cyclin-dependent kinase 9
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3
FOSB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B
MAP4K4	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4
SPTY2D1	SPT2, Suppressor of Ty, domain containing 1 (S. cerevisiae)

Genes blancos	
CDK6	cyclin-dependent kinase 6
MAX	MYC associated factor X
GSPT1	G1 to S phase transition 1
TNFRSF21	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
CAPRIN1	cell cycle associated protein 1
RAP2C	RAP2C, member of RAS oncogene family
RASA1	RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1
RAP2B	RAP2B, member of RAS oncogene family
RAP1A	RAP1A, member of RAS oncogene family
BMP6	bone morphogenetic protein 6
BMI1	BMI1 polycomb ring finger oncogene
WRNIP1	Werner helicase interacting protein 1
MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14
MTSS1	metastasis suppressor 1
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
RAPH1	Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1
SUGT1	SGT1, suppressor of G2 allele of SKP1 (S. cerevisiae)
CDK5R1	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)
CCND2	cyclin D2
TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1
TPD52	tumor protein D52

TRIAP1	TP53 regulated inhibitor of apoptosis 1
XRRA1	X-ray radiation resistance associated 1
PTEN	phosphatase and tensin homolog

hsa-miR-324-5p	
Genes blancos	
FANCA	Fanconi anemia, complementation group A

hsa-miR-376c-3p		Genes blancos	
RASAL2	RAS protein activator like 2		
SET	SET nuclear oncogene		
MAP2K4	mitogen-activated protein kinase kinase 4		
MAP4K3	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3		
MORF4L2	mortality factor 4 like 2		
NKTR	natural killer-tumor recognition sequence		

hsa-miR-454-3p		Genes blancos	
TP63	tumor protein p63		
ST18	suppression of tumorigenicity 18 (breast carcinoma) (zinc finger protein)		
RAB5B	RAB5B, member RAS oncogene family		
RAB5A	RAB5A, member RAS oncogene family		
BMPR2	bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)		
MYB	v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog		
MET	met proto-oncogene		
MAP3K9	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 9		
MAP3K12	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12		
MAF	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog		
TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1		
GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha		
TNFRSF1B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B		
TNF	tumor necrosis factor		
SOCS5	suppressor of cytokine signaling 5		
MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1		
RASA1	RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1		
PAK6	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 6		
BMP6	bone morphogenetic protein 6		
PRKAA2	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit		

CDKL2	cyclin-dependent kinase-like 2 (CDC2-related kinase)
WEE1	WEE1 G2 checkpoint kinase
SOCS6	suppressor of cytokine signaling 6

Genes blancos	
ADAMTSL3	ADAMTS-like 3
ARHGAP15	Rho GTPase activating protein 15
CBX1	chromobox homolog 1
CCNT2	cyclin T2
CCPG1	cell cycle progression 1
CDK8	cyclin-dependent kinase 8
CHCHD3	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3
CHSY1	chondroitin sulfate synthase 1
COL1A2	collagen, type I, alpha 2
CREBBP	CREB binding protein
CSNK1A1L	casein kinase 1, alpha 1-like
CTGF	connective tissue growth factor
DEK	DEK oncogene
DIDO1	death inducer-obliterator 1
FNDC3A	fibronectin type III domain containing 3A
FNDC4	fibronectin type III domain containing 4
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
HS2ST1	heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1
MAP2K4	mitogen-activated protein kinase kinase 4
RAP2B	RAP2B, member of RAS oncogene family
SMARCD2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 2
TPD52	tumor protein D52
XPO5	exportin 5
ZYG11B	zyg-11 family member B, cell cycle regulator

Genes blancos	
CAPRIN1	cell cycle associated protein 1
COL1A2	collagen, type I, alpha 2
GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
RAB5A	RAB5A, member RAS oncogene family
RAP2A	RAP2A, member of RAS oncogene family
RAP2B	RAP2B, member of RAS oncogene family

Genes blancos		
hsa-miR-628-5p	BLM	Bloom syndrome, RecQ helicase-like
	DEK	DEK oncogene
	MAP3K7	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
	MAX	MYC associated factor X
	RCOR1	REST corepressor 1
	RCOR3	REST corepressor 3
	SMARCAD1	SWI/SNF-related, matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a, containing DEAD/H box 1

Genes blancos		
hsa-miR-642a-5p	ACIN1	apoptotic chromatin condensation inducer 1
	BMP1	bone morphogenetic protein 1
	BMPR2	bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)
	CCND3	cyclin D3
	CDC14A	cell division cycle 14A
	HIC2	hypermethylated in cancer 2
	MAP3K2	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2
	RAP2A	RAP2A, member of RAS oncogene family
	UVRAG	UV radiation resistance associated

Genes blancos		
hsa-miR-655-3p	ATMIN	ATM interactor
	BCAS1	breast carcinoma amplified sequence 1
	BMPR2	bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)
	CASC4	cancer susceptibility candidate 4
	CBL	Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase
	CCND1	cyclin D1
	CCNE2	cyclin E2
	CCPG1	cell cycle progression 1
	CDC42	cell division cycle 42
	CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)
	CDKN2AIP	CDKN2A interacting protein
	GAS1	growth arrest-specific 1
	GAS7	growth arrest-specific 7
	MAFB	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B

MAP2K4	mitogen-activated protein kinase kinase 4
MAP4K3	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3
MAP4K4	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4
MAPK9	mitogen-activated protein kinase 9
RAB10	RAB10, member RAS oncogene family
RAB11A	RAB11A, member RAS oncogene family
RAB2A	RAB2A, member RAS oncogene family
RAB3GAP1	RAB3 GTPase activating protein subunit 1 (catalytic)
RAB3GAP2	RAB3 GTPase activating protein subunit 2 (non-catalytic)
RAB5A	RAB5A, member RAS oncogene family
RAB5B	RAB5B, member RAS oncogene family
SOCS6	suppressor of cytokine signaling 6
TP53INP1	tumor protein p53 inducible nuclear protein 1

Recursos materiales

Este protocolo forma parte de un proyecto mayor, que cuenta con financiamiento del Fondo Sectorial para Instituciones de Seguridad Social (FOSISS) CONACYT número 261525, convocatoria S0008-2015-2 y el monto otorgado es \$ 550,000.

Aspectos éticos y de bioseguridad

Este proyecto forma parte de una investigación mayor, el cual fue aprobado a los Comités de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Rehabilitación, Luis Guillermo Ibarra Ibarra.

Este proyecto es de riesgo mínimo

Carta de Consentimiento Informado (Pacientes mayores de 18 años)

Fecha _____

Número de registro _____

Apellido Paterno

Apellido Materno

Nombre (s)

Sexo

Carta de consentimiento informado para la participación voluntaria en el proyecto de investigación médica titulado: "Identificación de miRNAs como marcadores biológicos para la respuesta al tratamiento y/o desarrollo de metástasis en tumores óseos", que se realizará en el servicio de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra".

Justificación del estudio:

El osteosarcoma de alto grado tiene una tasa de sobrevida a 5 años del 70% y no ha sido posible mejorarla en los últimos 20 años. Esto se debe, en gran medida, a la capacidad que tiene el tumor de generar metástasis rápidamente, es decir propagarse a través de la sangre a otras partes del cuerpo, y a que en un número considerable de casos los medicamentos administrados no tienen el efecto deseado, porque el tumor es resistente a su acción. Los estudios de laboratorio con los que se cuenta actualmente para manejar estos dos aspectos del comportamiento del tumor son limitados, y no han logrado mejorar la sobrevida. El manejo de los pacientes representa actualmente una gran inversión de recursos humanos y económicos para el sistema de salud. Se sabe que cuando existen algunas enfermedades el cuerpo produce sustancias o elementos que pueden ser detectadas en líquidos corporales, como la sangre o la orina, estas sustancias pueden ser útiles para diagnosticar la enfermedad o conocer la etapa en la que se encuentra. Estas sustancias son llamadas marcadores biológicos por su capacidad de relacionarse a una enfermedad. Es necesario descubrir nuevos marcadores biológicos que puedan asociarse con la respuesta al tratamiento, o a la presencia de metástasis en los pacientes con osteosarcoma. La evidencia actual sugiere que los miRNAs (elementos generados por el cuerpo bajo condiciones normales o de enfermedad que pueden ser liberadas a la sangre) tienen el potencial de ser utilizados como marcadores biológicos. Además, son elementos que pueden obtenerse por métodos de mínima invasión, como una extracción de sangre. La magnitud de este estudio es que puede ayudar a desarrollar nuevas herramientas podrían tener un efecto positivo en la calidad de vida de los pacientes y contribuirían a mejorar la tasa de sobrevida. También se lograría un mejor uso de los recursos humanos y económicos destinados al tratamiento de estos pacientes. Además de ser útiles como biomarcadores, estos elementos nos pueden ayudar a comprender mejor el comportamiento del tumor, lo cual puede sentar las bases para nuevas estrategias de tratamiento.

Consentimiento:

Se le invita a participar de manera completamente voluntaria en el proyecto de investigación a cargo del Dr. Alberto Hidalgo Bravo, investigador del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) adscrito al servicio de genética. El objetivo de la investigación es encontrar factores útiles como herramienta de diagnóstico para la conocer el desarrollo de metástasis y respuesta al tratamiento en pacientes con osteosarcoma.

Su participación consiste en lo siguiente: durante la cirugía programada para el tratamiento del tumor, se tomará una muestra de tejido proveniente del tumor y otra muestra de tejido sano de la región adyacente al tumor. La toma de tejido será sólo en una ocasión y no implica un riesgo extra durante el procedimiento quirúrgico. Además, entre 12 y 24 horas antes de la cirugía se realizará una toma de muestra de sangre venosa (20 mililitros), con el propósito de obtener el suero de la sangre periférica, para posteriormente extraer el RNA. La toma de la muestra de sangre puede ser incómoda y en ocasiones puede resultar en un pequeño moretón en el sitio de punción y en raras ocasiones, puede ocurrir una infección. La muestra de sangre se tomará sólo en una ocasión. Aunque no se le soliciten nuevas muestras, los médicos que participan en la investigación darán seguimiento a la evolución de su enfermedad para conocer la respuesta a su tratamiento, o saber si hubo desarrollo de metástasis. Este seguimiento se hará consultando su expediente clínico y hasta que usted sea dado de alta.

El tratamiento que usted reciba o tenga programado en esta Institución no se verá modificado en ningún sentido si usted decide no participar en la investigación. También le informamos que los procedimientos que se realicen para este estudio no le generaran ningún costo extra. Debido a que este estudio no implica procedimientos extras, a los ya programados para su manejo, no se ofrece un tratamiento médico o indemnización por daños derivados de su participación en este estudio.

Su confidencialidad será protegida dentro de la ley y será mantenida por asignación de un código de números para toda su información. La clave de este código será bloqueado y sólo algunos miembros autorizados del equipo de investigación tendrá acceso al código de identificación.

Usted no recibirá ningún tipo de remuneración por su participación en el estudio. Los diferentes resultados de los análisis moleculares podrán ser publicados de manera anónima en revistas de difusión científica y que de momento no tienen utilidad en la asistencia médica. Los resultados de esta investigación pueden no representar un beneficio inmediato para el manejo de su enfermedad, sin embargo, es posible que sirvan como base para el desarrollo de futuros métodos de diagnóstico y/o seguimiento para personas con la misma condición médica. Si usted desea conocer los resultados de la investigación puede consultarlos con el investigador responsable.

Confirmó que se me ha explicado en detalle en que consiste el estudio y que he tenido tiempo de aclarar mis dudas acerca del mismo. Se me han explicado los riesgos de la participación en el estudio y que sólo el personal involucrado en el estudio tendrá acceso a mis datos personales y a las muestras que sean colectadas,

Al firmar esta carta de consentimiento acepto de participar voluntariamente y comprendo que por mi participación no recibiré beneficio económico ni de ningún otro tipo y se me ha informado que puedo declinar la invitación a participar en cualquier momento y esto no afectará la calidad de atención que recibo en el instituto.

Si usted tiene algún problema, pregunta, duda y aclaración o reclamación acerca de la investigación, no dude en ponerse en contacto con el Dr. Alberto Hidalgo Bravo del Instituto Nacional de Rehabilitación (tel. 59991000 ext. 19405. En caso de duda sobre sus derechos, el participante puede consultar al Comité de Ética en Investigación del INR, teléfono 59991000 ext. 18342.

Nombre y firma (o huella digital en caso necesario) del participante:

Nombre y firma (o huella digital en caso necesario) del representante legal:

Domicilio

Teléfono (s) _____

Testigo 1

Testigo 2

Nombre

Nombre

Firma

Firma

Relación con el participante del estudio

Relación con el participante del estudio

Nombre y firma del responsable de la toma de muestra _____

Consentimiento para resguardo de muestras y uso en futuros estudios

Se propone que las muestras colectadas formen parte de un banco de muestras resguardado en el Instituto Nacional de Rehabilitación. Estas muestras podrán ser utilizadas por los investigadores involucrados en el proyecto, en futuros estudios que persigan una meta en común al presente estudio.

Acepto que las muestras queden bajo resguardo de los investigadores involucrados en el presente proyecto y sean utilizadas en estudios con objetivos comunes al presente estudio. Se me ha explicado que en caso de no acceder al resguardo de las muestras estas no podrán ser utilizadas en nuevos estudios y serán destruidas al concluir el presente estudio.

Nombre y firma (o huella digital en caso necesario) del participante:

Nombre y firma (o huella digital en caso necesario) del representante legal:

Testigo 1

Testigo 2

Nombre

Nombre

Firma

Firma

Relación con el participante del estudio

Relación con el participante del estudio

Nombre y firma del responsable de la toma de muestra _____

Este documento se genera por duplicado, uno se conserva en el expediente de la investigación y el otro se entrega al participante.

Carta de Consentimiento Informado (Pacientes menores de 18 años)

Fecha _____

Número de registro _____

Apellido Paterno

Apellido Materno

Nombre (s)

Sexo

Carta de consentimiento informado para la participación voluntaria en el proyecto de investigación médica titulado: "Identificación de miRNAs como marcadores biológicos para la respuesta al tratamiento y/o desarrollo de metástasis en tumores óseos", que se realizará en el servicio de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra".

Justificación del estudio:

El osteosarcoma de alto grado tiene una tasa de sobrevida a 5 años del 70% y no ha sido posible mejorarla en los últimos 20 años. Esto se debe, en gran medida, a la capacidad que tiene el tumor de generar metástasis rápidamente, es decir propagarse a través de la sangre a otras partes del cuerpo, y a que en un número considerable de casos los medicamentos administrados no tienen el efecto deseado, porque el tumor es resistente a su acción. Los estudios de laboratorio con los que se cuenta actualmente para manejar estos dos aspectos del comportamiento del tumor son limitados, y no han logrado mejorar la sobrevida. El manejo de los pacientes representa actualmente una gran inversión de recursos humanos y económicos para el sistema de salud. Se sabe que cuando existen algunas enfermedades el cuerpo produce sustancias o elementos que pueden ser detectadas en líquidos corporales, como la sangre o la orina, estas sustancias pueden ser útiles para diagnosticar la enfermedad o conocer la etapa en la que se encuentra. Estas sustancias son llamadas marcadores biológicos por su capacidad de relacionarse a una enfermedad. Es necesario descubrir nuevos marcadores biológicos que puedan asociarse con la respuesta al tratamiento, o a la presencia de metástasis en los pacientes con osteosarcoma. La evidencia actual sugiere que los miRNAs (elementos generados por el cuerpo bajo condiciones normales o de enfermedad que pueden ser liberadas a la sangre) tienen el potencial de ser utilizados como marcadores biológicos. Además, son elementos que pueden obtenerse por métodos de mínima invasión, como una extracción de sangre. La magnitud de este estudio es que puede ayudar a desarrollar nuevas herramientas podrían tener un efecto positivo en la calidad de vida de los pacientes y contribuirían a mejorar la tasa de sobrevida. También se lograría un mejor uso de los recursos humanos y económicos destinados al tratamiento de estos pacientes. Además de ser útiles como biomarcadores, estos elementos nos pueden ayudar a comprender mejor el comportamiento del tumor, lo cual puede sentar las bases para nuevas estrategias de tratamiento.

Consentimiento:

Se invita a su hijo a participar de manera completamente voluntaria en el proyecto de investigación a cargo del Dr. Alberto Hidalgo Bravo, investigador del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) adscrito al servicio de genética. El objetivo de la investigación es encontrar factores útiles como herramienta de diagnóstico para la conocer el desarrollo de metástasis y respuesta al tratamiento en pacientes con osteosarcoma.

La participación de su hijo consiste en lo siguiente: durante la cirugía programada para el tratamiento del tumor, se tomará una muestra de tejido proveniente del tumor y otra muestra de tejido sano de la región adyacente al tumor. La toma de tejido será sólo en una ocasión y no implica un riesgo extra durante el procedimiento quirúrgico. Además, entre 12 y 24 horas antes de la cirugía se realizará una toma de muestra de sangre venosa (20 mililitros), con el propósito de obtener el suero de la sangre periférica, para posteriormente extraer el RNA. La toma de la muestra de sangre puede ser incómoda y en ocasiones puede resultar en un pequeño moretón en el sitio de punción y en raras ocasiones, puede ocurrir una infección. La muestra de sangre se tomará sólo en una ocasión. Las muestras colectadas formarán parte de un banco de muestras resguardado en el Instituto Nacional de Rehabilitación y que podrán ser utilizadas por los investigadores involucrados en el proyecto, en futuros estudios que persigan una meta en común al presente estudio. Aunque no se le soliciten nuevas muestras, los médicos que participan en la investigación darán seguimiento a la evolución de la enfermedad de su hijo para conocer la respuesta a su tratamiento, o saber si hubo desarrollo de metástasis. Este seguimiento se hará consultando el expediente clínico y hasta que su hijo sea dado de alta.

El tratamiento que su hijo reciba o tenga programado en esta Institución no se verá modificado en ningún sentido si usted decide no que él no participe en la investigación. También le informamos que los procedimientos que se realicen para este estudio no le generaran ningún costo extra. Debido a que este estudio no implica procedimientos extras, a los ya programados para el manejo de su hijo, no se ofrece un tratamiento médico o indemnización por daños derivados de su participación en este estudio.

La confidencialidad de su hijo será protegida dentro de la ley y será mantenida por asignación de un código de números para toda su información. La clave de este código será bloqueado y sólo algunos miembros autorizados del equipo de investigación tendrá acceso al código de identificación.

Su hijo no recibirá ningún tipo de remuneración por su participación en el estudio. Los diferentes resultados de los análisis moleculares podrán ser publicados de manera anónima en revistas de difusión científica y que de momento no tienen utilidad en la asistencia médica. Los resultados de esta investigación pueden no representar un beneficio inmediato para el manejo de la enfermedad, sin embargo, es posible que sirvan como base para el desarrollo de futuros métodos de diagnóstico y/o seguimiento para

personas con la misma condición médica. Si usted desea conocer los resultados de la investigación puede consultarlos con el investigador responsable.

Confirmó que se me ha explicado en detalle en que consiste el estudio y la participación de mi hijo, y que he tenido tiempo de aclarar mis dudas acerca del mismo. Se me han explicado los riesgos de la participación de mi hijo en el estudio y que sólo el personal involucrado en el estudio tendrá acceso a los datos personales y a las muestras que sean colectadas.

Al firmar esta carta de consentimiento acepto que mi hijo participe voluntariamente y comprendo que por su participación no recibiremos beneficio económico ni de ningún otro tipo. Se me ha informado que puedo declinar la invitación a que mi hijo participe en cualquier momento y esto no afectará la calidad de atención que reciba en el instituto.

Si usted tiene algún problema, pregunta, duda y aclaración o reclamación acerca de la investigación, no dude en ponerse en contacto con el Dr. Alberto Hidalgo Bravo del Instituto Nacional de Rehabilitación (tel. 59991000 ext. 19405. En caso de duda sobre sus derechos, el participante puede consultar al Comité de Ética en Investigación del INR, teléfono 59991000 ext. 18342.

Nombre y firma (o huella digital en caso necesario) del participante:

Nombre y firma (o huella digital en caso necesario) del representante legal:

Domicilio: _____

Teléfono (s) _____

Testigo 1

Testigo 2

Nombre

Nombre

Firma

Firma

Relación con el participante del estudio

Relación con el participante del estudio

Nombre y firma del responsable de la toma de muestra _____

Consentimiento para resguardo de muestras y uso en futuros estudios

Se propone que las muestras colectadas formen parte de un banco de muestras resguardado en el Instituto Nacional de Rehabilitación. Estas muestras podrán ser utilizadas por los investigadores involucrados en el proyecto, en futuros estudios que persigan una meta en común al presente estudio.

Acepto que las muestras de mi hijo queden bajo resguardo de los investigadores involucrados en el presente proyecto y sean utilizadas en estudios con objetivos comunes al presente estudio. Se me ha explicado que en caso de no acceder al resguardo de las muestras estas no podrán ser utilizadas en nuevos estudios y serán destruidas al concluir el presente estudio.

Nombre y firma (o huella digital en caso necesario) del participante:

Nombre y firma (o huella digital en caso necesario) del representante legal:

Testigo 1

Testigo 2

Nombre

Nombre

Firma

Firma

Relación con el participante del estudio

Relación con el participante del estudio

Nombre y firma del responsable de la toma de muestra _____

Este documento se genera por duplicado, uno se conserva en el expediente de la investigación y el otro se entrega al participante.

Carta de Consentimiento Informado (Controles mayores de 18 años)

Fecha _____

Número de registro _____

Apellido Paterno

Apellido Materno

Nombre (s)

Sexo

Carta de consentimiento informado para la participación voluntaria como individuo control en el proyecto de investigación médica titulado: “Identificación de miRNAs como marcadores biológicos para la respuesta al tratamiento y/o desarrollo de metástasis en tumores óseos”, que se realizará en el servicio de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”.

Justificación del estudio:

El osteosarcoma de alto grado tiene una tasa de sobrevivida a 5 años del 70% y no ha sido posible mejorarla en los últimos 20 años. Esto se debe, en gran medida, a la capacidad que tiene el tumor de generar metástasis rápidamente, es decir propagarse a través de la sangre a otras partes del cuerpo, y a que en un número considerable de casos los medicamentos administrados no tienen el efecto deseado, porque el tumor es resistente a su acción. Los estudios de laboratorio con los que se cuenta actualmente para manejar estos dos aspectos del comportamiento del tumor son limitados, y no han logrado mejorar la sobrevivida. El manejo de los pacientes representa actualmente una gran inversión de recursos humanos y económicos para el sistema de salud. Se sabe que cuando existen algunas enfermedades el cuerpo produce sustancias o elementos que pueden ser detectadas en líquidos corporales, como la sangre o la orina, estas sustancias pueden ser útiles para diagnosticar la enfermedad o conocer la etapa en la que se encuentra. Estas sustancias son llamadas marcadores biológicos por su capacidad de relacionarse a una enfermedad. Es necesario descubrir nuevos marcadores biológicos que puedan asociarse con la respuesta al tratamiento, o a la presencia de metástasis en los pacientes con osteosarcoma. La evidencia actual sugiere que los miRNAs (elementos generados por el cuerpo bajo condiciones normales o de enfermedad que pueden ser liberadas a la sangre) tienen el potencial de ser utilizados como marcadores biológicos. Además, son elementos que pueden obtenerse por métodos de mínima invasión, como una extracción de sangre. La magnitud de este estudio es que puede ayudar a desarrollar nuevas herramientas podrían tener un efecto positivo en la calidad de vida de los pacientes y contribuirían a mejorar la tasa de sobrevivida. También se lograría un mejor uso de los recursos humanos y económicos destinados al tratamiento de estos pacientes. Además de ser útiles como biomarcadores, estos elementos nos pueden ayudar a comprender mejor el comportamiento del tumor, lo cual puede sentar las bases para nuevas estrategias de tratamiento.

Consentimiento:

Se le invita a participar de manera completamente voluntaria como individuo control en el proyecto de investigación a cargo del Dr. Alberto Hidalgo Bravo, investigador del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) adscrito al servicio de genética. El objetivo de la investigación es encontrar factores útiles como herramienta de diagnóstico para la conocer el desarrollo de metástasis y respuesta al tratamiento en pacientes con osteosarcoma.

Su participación consiste en lo siguiente: se realizará una toma de muestra de sangre venosa (20 mililitros), con el propósito de obtener el suero de la sangre periférica, para posteriormente extraer el RNA. La toma de la muestra de sangre puede ser incómoda y en ocasiones puede resultar en un pequeño moretón en el sitio de punción y en raras ocasiones, puede ocurrir una infección. La muestra de sangre se tomará sólo en una ocasión.

Su confidencialidad será protegida dentro de la ley y será mantenida por asignación de un código de números para toda su información. La clave de este código será bloqueado y sólo algunos miembros autorizados del equipo de investigación tendrá acceso al código de identificación.

Usted no recibirá ningún tipo de remuneración por su participación en el estudio. Los diferentes resultados de los análisis moleculares podrán ser publicados de manera anónima en revistas de difusión científica y que de momento no tienen utilidad en la asistencia médica. Los resultados de esta investigación pueden no representar un beneficio inmediato para el manejo de la enfermedad, sin embargo, es posible que sirvan como base para el desarrollo de futuros métodos de diagnóstico y/o seguimiento para personas con esta condición médica. Si usted desea conocer los resultados de la investigación puede consultarlos con el investigador responsable.

Confirmó que se me ha explicado en detalle en que consiste el estudio y que he tenido tiempo de aclarar mis dudas acerca del mismo. Se me han explicado los riesgos de la participación en el estudio y que sólo el personal involucrado en el estudio tendrá acceso a mis datos personales y a las muestras que sean colectadas,

Al firmar esta carta de consentimiento acepto de participar voluntariamente y comprendo que por mi participación no recibiré beneficio económico ni de ningún otro tipo y se me ha informado que puedo declinar la invitación a participar en cualquier momento.

Si usted tiene algún problema, pregunta, duda y aclaración o reclamación acerca de la investigación, no dude en ponerse en contacto con el Dr. Alberto Hidalgo Bravo del Instituto Nacional de Rehabilitación (tel. 59991000 ext. 19405. En caso de duda sobre sus derechos, el participante puede consultar al Comité de Ética en Investigación del INR, teléfono 59991000 ext. 18342.

Nombre y firma (o huella digital en caso necesario) del participante:

Nombre y firma (o huella digital en caso necesario) del representante legal:

Domicilio

Teléfono (s)_____

Testigo 1

Testigo 2

Nombre

Nombre

Firma

Firma

Relación con el participante del estudio

Relación con el participante del estudio

Nombre y firma del responsable de la toma de muestra_____

Consentimiento para resguardo de muestras y uso en futuros estudios

Se propone que las muestras colectadas formen parte de un banco de muestras resguardado en el Instituto Nacional de Rehabilitación. Estas muestras podrán ser utilizadas por los investigadores involucrados en el proyecto, en futuros estudios que persigan una meta en común al presente estudio.

Acepto que las muestras queden bajo resguardo de los investigadores involucrados en el presente proyecto y sean utilizadas en estudios con objetivos comunes al presente estudio. Se me ha explicado que en caso de no acceder al resguardo de las muestras estas no podrán ser utilizadas en nuevos estudios y serán destruidas al concluir el presente estudio.

Nombre y firma (o huella digital en caso necesario) del participante:

Nombre y firma (o huella digital en caso necesario) del representante legal:

Testigo 1

Testigo 2

Nombre

Nombre

Firma

Firma

Relación con el participante del estudio

Relación con el participante del estudio

Nombre y firma del responsable de la toma de muestra _____

Este documento se genera por duplicado, uno se conserva en el expediente de la investigación y el otro se entrega al participante.

Carta de Consentimiento Informado (Controles menores de 18 años)

Fecha _____

Número de registro _____

Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombre (s)	Sexo
------------------	------------------	------------	------

Carta de consentimiento informado para la participación voluntaria como individuo control en el proyecto de investigación médica titulado: “Identificación de miRNAs como marcadores biológicos para la respuesta al tratamiento y/o desarrollo de metástasis en tumores óseos”, que se realizará en el servicio de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”.

Justificación del estudio:

El osteosarcoma de alto grado tiene una tasa de supervivencia a 5 años del 70% y no ha sido posible mejorarla en los últimos 20 años. Esto se debe, en gran medida, a la capacidad que tiene el tumor de generar metástasis rápidamente, es decir propagarse a través de la sangre a otras partes del cuerpo, y a que en un número considerable de casos los medicamentos administrados no tienen el efecto deseado, porque el tumor es resistente a su acción. Los estudios de laboratorio con los que se cuenta actualmente para manejar estos dos aspectos del comportamiento del tumor son limitados, y no han logrado mejorar la supervivencia. El manejo de los pacientes representa actualmente una gran inversión de recursos humanos y económicos para el sistema de salud. Se sabe que cuando existen algunas enfermedades el cuerpo produce sustancias o elementos que pueden ser detectadas en líquidos corporales, como la sangre o la orina, estas sustancias pueden ser útiles para diagnosticar la enfermedad o conocer la etapa en la que se encuentra. Estas sustancias son llamadas marcadores biológicos por su capacidad de relacionarse a una enfermedad. Es necesario descubrir nuevos marcadores biológicos que puedan asociarse con la respuesta al tratamiento, o a la presencia de metástasis en los pacientes con osteosarcoma. La evidencia actual sugiere que los miRNAs (elementos generados por el cuerpo bajo condiciones normales o de enfermedad que pueden ser liberadas a la sangre) tienen el potencial de ser utilizados como marcadores biológicos. Además, son elementos que pueden obtenerse por métodos de mínima invasión, como una extracción de sangre. La magnitud de este estudio es que puede ayudar a desarrollar nuevas herramientas podrían tener un efecto positivo en la calidad de vida de los pacientes y contribuirían a mejorar la tasa de supervivencia. También se lograría un mejor uso de los recursos humanos y económicos destinados al tratamiento de estos pacientes. Además de ser útiles como biomarcadores, estos elementos nos pueden ayudar a comprender mejor el comportamiento del tumor, lo cual puede sentar las bases para nuevas estrategias de tratamiento.

Consentimiento:

Se invita a su hijo a participar de manera completamente voluntaria como individuo control en el proyecto de investigación a cargo del Dr. Alberto Hidalgo Bravo, investigador del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) adscrito al servicio de genética. El objetivo de la investigación es encontrar factores útiles como herramienta de diagnóstico para la conocer el desarrollo de metástasis y respuesta al tratamiento en pacientes con osteosarcoma.

La participación de su hijo consiste en lo siguiente: se realizará una toma de muestra de sangre venosa (20 mililitros), con el propósito de obtener el suero de la sangre periférica, para posteriormente extraer el RNA. La toma de la muestra de sangre puede ser incómoda y en ocasiones puede resultar en un pequeño moretón en el sitio de punción y en raras ocasiones, puede ocurrir una infección. La muestra de sangre se tomará sólo en una ocasión. Las muestras colectadas formarán parte de un banco de muestras resguardado en el Instituto Nacional de Rehabilitación y que podrán ser utilizadas por los investigadores involucrados en el proyecto, en futuros estudios que persigan una meta en común al presente estudio.

La confidencialidad de su hijo será protegida dentro de la ley y será mantenida por asignación de un código de números para toda su información. La clave de este código será bloqueado y sólo algunos miembros autorizados del equipo de investigación tendrá acceso al código de identificación.

Su hijo no recibirá ningún tipo de remuneración por su participación en el estudio. Los diferentes resultados de los análisis moleculares podrán ser publicados de manera anónima en revistas de difusión científica y que de momento no tienen utilidad en la asistencia médica. Los resultados de esta investigación pueden no representar un beneficio inmediato para el manejo de esta enfermedad, sin embargo, es posible que sirvan como base para el desarrollo de futuros métodos de diagnóstico y/o seguimiento para personas con esta misma condición médica. Si usted desea conocer los resultados de la investigación puede consultarlos con el investigador responsable.

Confirmó que se me ha explicado en detalle en que consiste el estudio y la participación de mi hijo como individuo control, y que he tenido tiempo de aclarar mis dudas acerca del mismo. Se me han explicado los riesgos de la participación de mi hijo en el estudio y que sólo el personal involucrado en el estudio tendrá acceso a los datos personales y a las muestras que sean colectadas.

Al firmar esta carta de consentimiento acepto que mi hijo participe voluntariamente y comprendo que por su participación no recibiremos beneficio económico ni de ningún otro tipo. Se me ha informado que puedo declinar la invitación a que mi hijo participe en cualquier momento y esto no afectará la calidad de atención que reciba en el instituto.

Si usted tiene algún problema, pregunta, duda y aclaración o reclamación acerca de la investigación, no dude en ponerse en contacto con el Dr. Alberto Hidalgo Bravo del Instituto Nacional de Rehabilitación (tel. 59991000 ext. 19405. En caso de duda sobre sus derechos, el participante puede consultar al Comité de Ética en Investigación del INR, teléfono 59991000 ext. 18342.

Nombre y firma (o huella digital en caso necesario) del participante:

Nombre y firma (o huella digital en caso necesario) del representante legal:

Domicilio

Teléfono (s) _____

Testigo 1

Testigo 2

Nombre

Nombre

Firma

Firma

Relación con el participante del estudio

Relación con el participante del estudio

Nombre y firma del responsable de la toma de muestra _____

Consentimiento para resguardo de muestras y uso en futuros estudios

Se propone que las muestras colectadas formen parte de un banco de muestras resguardado en el Instituto Nacional de Rehabilitación. Estas muestras podrán ser utilizadas por los investigadores involucrados en el proyecto, en futuros estudios que persigan una meta en común al presente estudio.

Acepto que las muestras de mi hijo queden bajo resguardo de los investigadores involucrados en el presente proyecto y sean utilizadas en estudios con objetivos comunes al presente estudio. Se me ha explicado que en caso de no acceder al resguardo de las muestras estas no podrán ser utilizadas en nuevos estudios y serán destruidas al concluir el presente estudio.

Nombre y firma (o huella digital en caso necesario) del participante:

Nombre y firma (o huella digital en caso necesario) del representante legal:

Testigo 1

Testigo 2

Nombre

Nombre

Firma

Firma

Relación con el participante del estudio

Relación con el participante del estudio

Nombre y firma del responsable de la toma de muestra _____

Este documento se genera por duplicado, uno se conserva en el expediente de la investigación y el otro se entrega al participante.

