



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN LGII
CIENCIAS MÉDICAS

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *p53*, *p63*, *RANKL*, *IHH* y *CTSK*
EN TEJIDO TUMORAL Y SANO DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE
TUMOR DE CÉLULAS GIGANTES ÓSEO

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

PRESENTA:
ERÉNDIRA GEORGINA ESTRADA VILLASEÑOR

TUTOR: Dr. Alberto Hidalgo Bravo
Instituto Nacional de Rehabilitación LGII

Comité Tutorial: Dra. Margarita Valdés Flores. INR LGII
Dr. Antonio Miranda Duarte. INR LGII
Dra. Verónica Morán Barroso. HIMFG

Cd. Mx septiembre 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TUTOR

Vo. Bo. DR. ALBERTO HIDALGO BRAVO

RESPONSABLE DE LA ENTIDAD ACADÉMICA
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS UNAM

Vo. Bo. DRA. MARGARITA VALDÉS FLORES

ALUMNA

ERÉNDIRA GEORGINA ESTRADA VILLASEÑOR

Indice

1. INTRODUCCIÓN	1
Características clínicas:	1
Características histológicas:	1
Comportamiento biológico:	2
Tratamiento:.....	3
Clasificación radiológica de los TCG	3
Gradificación histológica de los TCG	3
Expresión génica en los tumores de células gigantes:	4
<i>p53</i>	4
<i>p63</i>	7
<i>CTSK</i>	11
<i>RANKL</i>	13
<i>IHH</i>	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
3. JUSTIFICACIÓN:	16
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:	16
5. HIPÓTESIS.....	17
6. OBJETIVO GENERAL	17
7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
8. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
Tipo de estudio:.....	17
Universo de trabajo:.....	17
Unidades de observación:.....	17
CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	18
Para toma de tejido.....	18
Para PCR en tiempo real:.....	18
Para el análisis estadístico:.....	18
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:	18
CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:	18

Para la toma de tejido	18
Para obtención de RNA total.....	18
Para PCR en tiempo real.....	19
DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO.....	19
TAMAÑO DE LA MUESTRA	19
MUESTREO:	20
PROCEDIMIENTOS:	21
Técnica de la toma de muestras:	21
Información clínica:	22
Obtención de RNA total de tejido óseo:	22
Control de calidad del RNA	22
RT-PCR	23
PCR en tiempo real.....	23
CÁLCULO DE EXPRESIÓN RELATIVA:.....	24
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
9. RESULTADOS:	26
Obtención de muestras y características clínicas de los pacientes:.....	26
Obtención de RNA total de muestras:	27
PCR en tiempo real:.....	27
Cálculo de la expresión relativa:	27
Análisis estadístico:	28
Expresión relativa	28
10. DISCUSIÓN:	29
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	29
<i>P53</i>	29
<i>P63</i>	30
<i>RANKL</i>	30
<i>CTSK</i>	30
<i>IHH</i>	31
Dificultades para la obtención del RNA.....	31
Limitaciones del estudio.....	32

11. CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO:	32
CONCLUSIONES	32
TRABAJO FUTURO	32
BIBLIOGRAFÍA.....	34
A P É N D I C E.....	41
Apéndice A:	42
Tabla A1. Cuantificación Relativa de <i>p53</i> en Tejido con tumor y sin tumor.	42
Tabla A2. Cuantificación Relativa de <i>p63</i> en Tejido con tumor y sin tumor.	43
Tabla A3. Cuantificación Relativa de <i>RANKL</i> en Tejido con tumor y sin tumor.	44
Tabla A4. Cuantificación Relativa de <i>CTSK</i> en Tejido con tumor y sin tumor.	45
Tabla A5 . Cuantificación Relativa de <i>IHH</i> en Tejido con tumor y sin tumor.	46
Tabla A6. Expresión relativa de <i>p53</i> , <i>p63</i> , <i>RANKL</i> , <i>CTSK</i> e <i>IHH</i> en tejido sin tumor de células gigantes y con tumor de células gigantes	47
Apéndice B	48
Consentimiento Informado	48

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE *p53*, *p63*, *RANKL*, *IHH* y *CTSK* EN TEJIDO TUMORAL Y SANO DE PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE TUMOR DE CÉLULAS GIGANTES ÓSEO

1. INTRODUCCIÓN

El tumor de células gigantes (TCG), descrito por primera vez en 1818 por Astley Cooper¹, es un tumor óseo primario con comportamiento biológico variable, cuya frecuencia es diferente de acuerdo al país, siendo de 5% en los Estados Unidos de América², 20% en China y la India^{3,4} y 17% en México⁵. Este tumor es más frecuente en mujeres⁶, aunque en algunas series se reporta una distribución igual en cuanto a sexo⁷.

Características clínicas:

El TCG afecta a personas esqueléticamente maduras, presentándose con mayor frecuencia en la tercera década de la vida. 80% de los casos ocurren entre los 20 y 50 años, es decir en población económicamente activa. Los casos de TCG que se presentan antes de los 14 años sólo ocupan el 3% y los casos que se presentan en pacientes mayores de los 50 años sólo ocupan el 13% de los tumores de células gigantes (TCGs)⁸.

Gran parte de las lesiones se encuentran en la epífisis de los huesos largos (75-90%), con la mayoría de los casos (50-65%) localizados alrededor de la rodilla. Las localizaciones más frecuentes son fémur distal, tibia proximal y radio distal^{9,10}. El TCG también puede afectar huesos planos como pelvis, sacro, columna y costillas. Los huesos de las manos y pies pueden verse afectados aunque con mucha menor frecuencia^{11,12}.

El TCG se puede encontrar asociado a quiste óseo aneurismático (QOA), enfermedad de Paget y puede ser componente de otros tumores como el condrosarcoma desdiferenciado^{13,14}. Cuando el TCG se asocia a QOA (15-35% de los casos) sus características clínicas y de imagen difieren a las del TCG convencional¹⁵. De igual forma, cuando el TCG se asocia a enfermedad de Paget, presenta localizaciones poco frecuentes como huesos faciales, pelvis, columna y cráneo¹⁶.

Características histológicas:

El TCG se encuentra compuesto por tres tipos de células: 1) células gigantes multinucleadas tipo osteoclasto, 2) células estromales mononucleadas y 3) células semejantes a monocitos. Se pueden encontrar también otros componentes como los macrófagos espumosos y depósito de hemosiderina (Figura 1). Las células gigantes multinucleadas, de igual manera que los osteoclastos, son capaces de llevar a cabo la reabsorción ósea y osteólisis. Las células estromales secretan citocinas y factores de diferenciación, incluyendo la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP1), el factor de

diferenciación de osteoclastos (ODF) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF). Estas moléculas por quimiotaxis atraen a los monocitos, además de ser indispensables para la diferenciación de los osteoclastos¹⁷. Con los datos que se cuenta hasta el momento en la literatura, se sugiere que las células estromales estimulan la migración de los monocitos de la sangre hacia el tejido tumoral promoviendo su fusión para formar células gigantes multinucleadas tipo osteoclasto. Las células estromales son consideradas el componente neoplásico y las células gigantes multinucleadas junto con los monocitos, son consideradas el componente reactivo¹⁸.

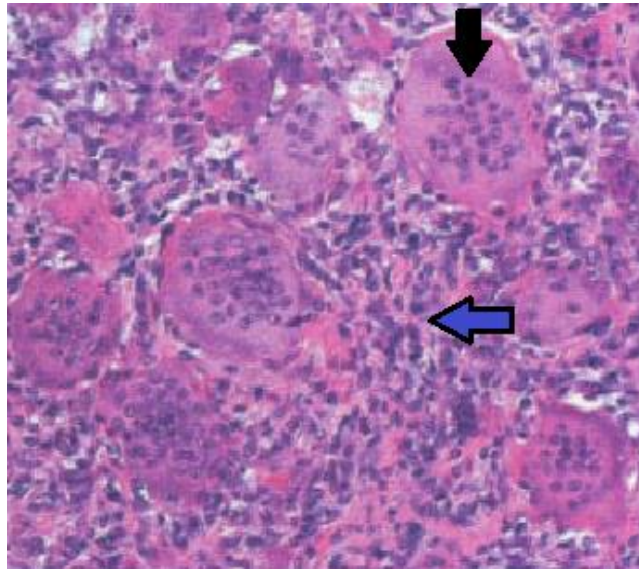


Figura 1: Corte histológico de Tumor de Células Gigantes donde se observan células estromales (flecha azul) alternando con células gigantes multinucleadas tipo osteoclasto (flecha negra). Tomado de Wülling et al ¹⁷

Comportamiento biológico:

El TCG es considerado como una neoplasia benigna de agresividad “variable” debido a que, aunque puede tener una localización exclusivamente intramedular, también puede extenderse y afectar a los tejidos blandos adyacentes. El TCG puede presentar recurrencias hasta en un 50% de los casos ¹⁹, puede presentarse acompañado de implantes pulmonares en un 5-10% de los casos^{20, 21} y también puede presentar transformación maligna en un 1-3% de los casos dando lugar a un tumor de células gigantes maligno, histiocitoma fibroso maligno, fibrosarcoma u osteosarcoma²². La transformación maligna de los TCGs en general es secundaria a radioterapia (1% de los casos con radioterapia) o como resultado de la dediferenciación de un tumor primario con una o múltiples recurrencias. La radioterapia queda reservada para los pacientes con un tumor difícil de reseca como los de columna vertebral²³ o para aquellos que no pueden ser operados por razones médicas, siendo aproximadamente el 3-6% de los TCGs.

En el caso de los implantes pulmonares estos pueden ser únicos o múltiples y aunque histológicamente no presentan características de malignidad, algunos estudios han encontrado mayor expresión de p53 en comparación con el tumor óseo primario²⁴.

Tratamiento:

El tratamiento de los TCG es principalmente quirúrgico en sus diferentes modalidades como resección en bloque, resección intralesional (curetaje) con injerto óseo, curetaje con tratamiento adyuvante (alcohol, fenol), o embolización arterial selectiva²⁵. Para aquellos casos en los que no es posible realizar la cirugía o en los que esta se puede asociar a una gran morbilidad, el anticuerpo monoclonal anti-RANKL (denosumab) es una nueva opción²⁶.

Clasificación radiológica de los TCG

Campanaci clasificó a los TCG de acuerdo a sus características radiológicas utilizando las denominaciones Grado I, Grado II, Grado II con fractura y Grado III²⁷.

El tumor de grado I es intramedular, tiene bordes bien definidos y la cortical está intacta.

El tumor de grado II es expansivo, adelgaza la cortical, tiene bordes relativamente bien definidos y puede presentar borde de hueso reactivo. Las lesiones de grado II con una fractura se clasifican por separado.

El tumor de grado III presenta bordes mal definidos, lo que sugiere un crecimiento rápido. El tumor se extiende hacia los tejidos blandos adyacentes y no está limitado por una cáscara aparente de hueso reactivo.

Gradificación histológica de los TCG

Basándose en el aspecto histológico de las células estromales, la cantidad de células gigantes multinucleadas y las mitosis, Jaffe propuso una gradificación histológica en los TCG.

De acuerdo a esta clasificación los TCG grado 1 consisten en células estromales cuyos núcleos no presentan atipias y son semejantes a los núcleos de las células gigantes multinucleadas. En estos tumores las células gigantes multinucleadas son abundantes. Los TCG grado 2 son aquellos en los cuales las células estromales presentan abundantes figuras de mitosis sin presentar atipias nucleares. En estos tumores las células gigantes multinucleadas se presentan en menor cantidad en comparación con los TCG grado 1. Los TCG grado 3 son aquellos en los cuales las células gigantes multinucleadas se encuentran alternando con células que presentan características francas de sarcoma, es decir atipia nuclear, así como también abundantes figuras de mitosis.

Jaffe relacionó el grado histológico de los TCG con su comportamiento clínico, de tal manera que los TCG grado 1 consistían en lesiones benignas, limitadas al hueso, no recidivantes. Los TCG grado 2 consistían en lesiones benignas agresivas, con extensión a

tejidos blandos y alta probabilidad de recurrencia. Los TCG grado 3 consistían en tumores malignos, con comportamiento clínico de sarcoma²⁸.

Sin embargo, trabajos que surgieron posteriormente informaron que el aspecto histológico de los TCGs no muestra relación alguna con su agresividad local, así como tampoco con su capacidad metastásica o de degeneración maligna^{29,30,31}.

Debido a que al parecer el aspecto histológico de los TCG no muestra relación con su comportamiento biológico, estos tumores se han estudiado también desde el punto de vista molecular, para determinar si es posible identificar proteínas indicadoras de pronóstico y así poder brindar mejores opciones terapéuticas.

Expresión génica en los tumores de células gigantes:

El análisis de expresión génica mediante microarreglos ha identificado diversos genes en los TCGs que se expresan de forma diferencial en el tejido neoplásico en comparación con hueso con osteoartritis y/o hueso sano. Algunos de estos genes se encuentran implicados en el ciclo celular, crecimiento celular y apoptosis. Además, otros promueven un ambiente osteoclastogénico o son expresados también por los osteoclastos³².

Entre dichos genes se encuentran *p53*, *p63*, *RANKL*, *CTSK* e *IHH*.

p53

La proteína p53 se descubrió en 1979 en células cancerosas transformadas por virus³³. Durante la primera década después de su descubrimiento, se consideró que la proteína p53 estaba codificada por un protooncogén debido a su efecto sobre el crecimiento celular y la supervivencia cuando se expresaba en líneas celulares. Ahora se sabe que esta investigación inicial que describía la función de *p53* se realizó inadvertidamente en genes mutantes de *p53* en lugar de la forma silvestre³⁴.

p53 es una proteína reguladora maestra que se expresa en el núcleo, donde también ejerce su función. Está implicada en diversos procesos metabólicos celulares tales como apoptosis, reparación del DNA y detención del ciclo celular. La función protectora de p53 (en su forma homotetramérica) como un supresor de tumores se pierde en más del 50% de los cánceres humanos^{35,36}.

La proteína p53 es un factor de transcripción que regula la transcripción de genes que son responsables de las funciones asociadas a p53: inhibición del ciclo celular, la reparación del daño en el DNA y apoptosis.

Inhibición del ciclo celular: Cuando se produce daño en el DNA se lleva a cabo la detención del ciclo celular en el punto control G1/S o G2/M mediada por p53. La detención del ciclo celular en la transición G1/S se debe a la transcripción dependiente de p53 del inhibidor de cinasa dependiente de ciclina p21. P21 inhibe los complejos CDK-ciclina y evita la fosforilación de pRB, de manera que el factor de transcripción E2F

permanece inactivo, y se impide la progresión de la célula hacia la fase S (de síntesis del DNA). Esta "pausa" en la progresión del ciclo celular da tiempo a reparar los daños producidos en el DNA.

Reparación del daño en el DNA: Uno de los genes diana de p53 es *p53R2* que codifica para una reductasa de ribonucleótidos importante en la replicación y reparación del DNA. p53 también interacciona directamente con la endonucleasa AP y la DNA polimerasa que están implicadas en la reparación por escisión. Además, p53 induce a ciertas proteínas, como GADD45 que colaboran en la reparación del DNA. Si el daño se repara correctamente, p53 estimula la síntesis de MDM2, activando su autodestrucción y permitiendo la progresión en el ciclo celular. Si el daño no puede ser reparado, la célula puede entrar en apoptosis o en senescencia, ambos inducidos por p53.

Activación de la apoptosis: La activación de la apoptosis es el último mecanismo protector, si el daño en el DNA es irreparable, para evitar la proliferación de las células que contienen DNA anormal. P53 activa la expresión de genes pro-apoptosis, como BAX o PUMA. Al parecer p53 presenta mayor afinidad por los promotores de los genes de reparación del DNA que por los promotores de los genes pro-apoptosis, de manera que primero se activa la reparación del DNA. Pero si ésta no es efectiva y p53 continúa acumulándose, se activan los genes pro-apoptosis.

La pérdida de *p53* es un factor principal del desarrollo del cáncer, principalmente porque en ausencia de este "guardián del genoma" las células no detienen su proliferación para reparar el DNA dañado, ni promover la muerte celular programada. Como resultado, las células acumulan mutaciones y continúan proliferando³⁷.

El gen *p53* es el gen más comúnmente mutado en el cáncer humano. La mayoría de las alteraciones implican mutaciones sin sentido de *p53*, lo que resulta en la producción de proteínas disfuncionales. Además, en cánceres en los que el gen *p53* permanece intacto, la función de *p53* se deteriora con frecuencia. Por ejemplo, por la interferencia de proteínas virales o por la regulación positiva de reguladores negativos de p53, como la ubiquitina ligasa E3³⁸.

Algunos TCGs son positivos por inmunohistoquímica para *p53*³⁹, encontrándose su expresión en los núcleos ya sea de las células estromales o de las células gigantes multinucleadas, aunque no en forma generalizada.

El primer estudio que se hizo de *p53* en tumores de células gigantes, se realizó en tejido de tumores primarios, no recidivantes, no malignos, ni metastatizantes. Los 10 casos evaluados, no mostraron alteraciones en la estructura ni en la expresión de *p53*⁴⁰. Posteriormente Wu Y. et al., estudiaron *p53* en 29 tumores de células gigantes primarios, siendo el 79% de los casos positivos por inmunohistoquímica. Sin embargo, en este estudio no se encontró asociación entre la presencia de *p53* y ciertas características

clínicas (edad, sexo y localización), e histológicas de estos tumores (cantidad de células gigantes, actividad mitótica y anaplasia)⁴¹.

En 1998 Masui F. et al., estudiaron la expresión de *p53* por inmunohistoquímica en 47 tumores de células gigantes y encontraron su expresión en sólo 6 de estos tumores. Es preciso señalar que sólo los tumores que fueron positivos para *p53* mostraron recurrencia y/o metástasis pulmonares⁴².

En referencia a los tumores de células gigantes malignos secundarios a recidivas, sin antecedente de radioterapia, en el 2001 se reportaron mutaciones en *p53* y su positividad por inmunohistoquímica en uno de dos casos⁴³, con ausencia de alteraciones en el tumor primario.

Posteriormente Gong⁴⁴ encontró también por inmunohistoquímica positividad para *p53* en los TCGs malignos secundarios (Figura 2). Okubo T. et al., encontraron sobreexpresión de *p53* en todos los casos de TCGs malignos y ausencia de expresión en los tumores de células gigantes convencionales⁴⁵.

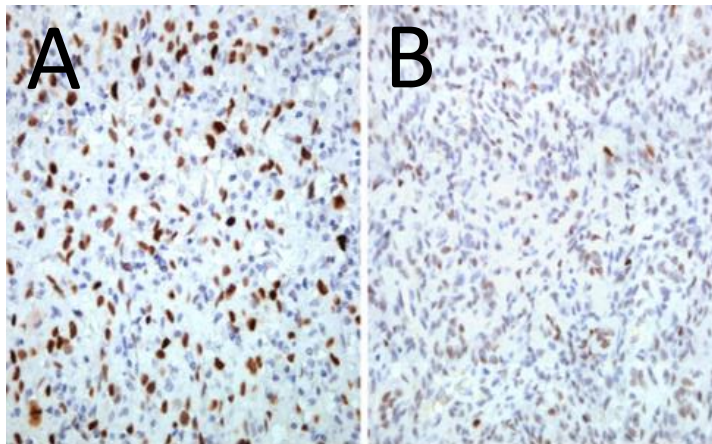


Figura 2: A) Intensa expresión de *p53* en los núcleos de las células estromales de un TCG maligno secundario, B) Ligerísima expresión de *p53* en un TCG convencional. Tomado de Gong L., et al³⁹.

Cheng encontró una expresión similar de *p53* por inmunohistoquímica en los tumores primarios y en los que presentaron recurrencias⁴⁶. En contraste, Lujic et al., encontraron en su estudio que *p53* era el factor predictivo más significativo para recurrencias. Los TCGs positivos para *p53* mostraron 6 veces más riesgo de recurrencia en comparación con los negativos⁴⁷.

Con resultados tan variables sobre la expresión de *p53* en los TCGs es difícil, en este momento, establecer su utilidad como factor de apoyo al pronóstico. Al parecer, los últimos estudios establecen cierta relación con el comportamiento clínico de estos tumores.

p63

p63 pertenece a la familia *p53/p63/p73* y se expresa en el núcleo de la célula. Los tres genes regulan el ciclo celular y la apoptosis después del daño al ADN. Sin embargo, a pesar de existir una notable similitud estructural y parcialmente funcional entre *p53*, *p63* y *p73*, los estudios de ratones knockout revelan una diversidad funcional entre ellos. En ausencia de *p63* y *p73* se presentan graves anomalías del desarrollo, pero no aumento de la susceptibilidad al cáncer, mientras que esta imagen se invierte en ausencia de *p53*⁴⁸.

p63 codifica para múltiples isoformas que pueden clasificarse en 2 categorías: las que tienen un dominio de transactivación ácida, conocidas como isoformas TA; y las isoformas que carecen de este dominio, conocidas como isoformas ΔN . Las isoformas TA funcionan como genes supresores tumorales y las isoformas ΔN son oncogenes que antagonizan a *p53*⁴⁹.

El extremo C terminal de TAp63 y $\Delta Np63$, a su vez puede tener empalmes alternativos (α , β , γ) resultando finalmente 6 isoformas. Estas isoformas difieren en su actividad transcripcional y función, además de poder ser expresadas tanto en tejido normal como en tejido neoplásico.

p63 también puede regular la expresión génica a través de vías independientes de *p53* para genes más específicos que están asociados con el desarrollo, la diferenciación epitelial terminal y la adhesión celular, entre los cuales se encuentran el gen de interleucina-1- α y TCF7L1⁵⁰.

Es decir, cada vez existe mayor evidencia de que *p63* está involucrado en la oncogénesis a través de diferentes mecanismos siendo uno de ellos la interacción directa con la proteína MM1 (Modulador Myc 1)⁵¹.

La primera descripción que se llevó a cabo de *p63* en tumores óseos fue en el 2004 por Park HR et al., quienes encontraron niveles de expresión bajos tanto de *p63*, como de *p73* en los osteosarcomas⁵². Kallen E también realizó un estudio con respecto a la utilidad de *p63* en el diagnóstico de tumores osteoblásticos, observando que el 33.3% de los osteosarcomas fueron positivos y el 87.5% de los osteoblastomas. Ese trabajo concluyó que *p63* no es de utilidad diagnóstica como marcador de diferenciación osteoblástica, ya que en aquellos sarcomas esqueléticos con evidencia mínima o nula de deposición neoplásica de osteoide (que actualmente se clasifican como fibrosarcomas o sarcomas pleomórficos indiferenciados), no se expresa *p63*⁵³.

Posteriormente en el 2008 Lee et al., analizaron el perfil de expresión génica de los TCGs, utilizando microarreglos y demostraron que la expresión de *p63* es significativamente mayor en los TCGs, en comparación con otros tumores primarios de hueso que se caracterizan también histológicamente por tener células gigantes multinucleadas y que están considerados en el diagnóstico histológico diferencial. Estos resultados llevaron a

Lee et al., a mencionar que *p63* podría ser un marcador útil en el diagnóstico de los Tumores de células gigantes⁵⁴.

Dickson B.C et al., en el 2008 analizaron la expresión de *p63* y encontraron que todas las formas de TAp63 se expresaban en las células mononucleadas de los TCGs, mientras que Np63 no se encontró expresado en los TCGs. Dickson et al., concluyeron que *p63* puede ser utilizado como un biomarcador para diferenciar al TCG de otros tumores que también contienen células gigantes⁵⁵.

Sin embargo, De la Roza en un estudio más extenso, con una mayor cantidad de casos tanto de TCGs como de lesiones con células gigantes, encontró mediante la técnica de inmunohistoquímica, que no todos los TCGs expresaban *p63* (86.9%), además de que otras lesiones también fueron positivas, incluyendo osteosarcomas (50%). De la Roza calculó además la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de esta técnica para el diagnóstico de este tumor, siendo estas de 86.95%, 53.36%, 45.45% y 91.17% respectivamente.

De la Roza hace énfasis en que *p63* presenta diferentes grados de expresión en las lesiones óseas con células gigantes, inclusive también en osteosarcomas y cuestiona su utilidad para diagnóstico⁵⁶.

Yanagisawa et al., hicieron un estudio exclusivamente con TCGs de huesos cortos y reportaron positividad heterogénea mediante inmunohistoquímica, siendo de sus 11 casos, cinco casos ligeramente positivos, tres positivos y uno intensamente positivo. Al presentar este último caso dos episodios de recurrencia, Yanagisawa mencionó que *p63* puede ser útil no solo como biomarcador para el diagnóstico diferencial en los TCGs de huesos cortos, sino también útil para el pronóstico de la agresividad⁵⁷.

Hammas et al.,⁵⁸ reportaron que 100% de los TCGs son positivos (5 casos) para *p63* con inmunohistoquímica. Sin embargo, en su estudio también fueron positivos el 100% de los condroblastomas y otros tumores incluyendo osteosarcomas (8.3%) Figura 3.

De Paula et al., realizaron un estudio retrospectivo, multicéntrico, en el que analizaron 291 tumores óseos “ricos en células gigantes”, incluyendo 119 TCGs. En este trabajo además de analizar la proporción de casos que fueron positivos, también se analizó la proporción de células que fueron positivas en cada caso y sus características (células

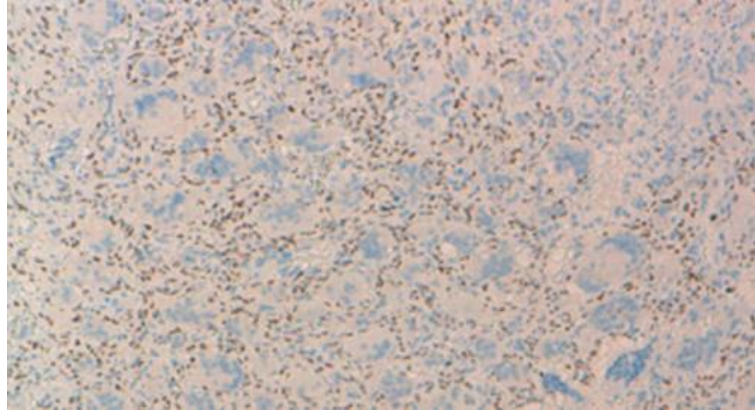


Figura 3: Tinción de inmunohistoquímica con p63 en un caso de TCG óseo con positividad en los núcleos de las células estromales. Tomado de Hammas³¹

gigantes multinucleadas o células mononucleadas). De acuerdo a los resultados de su trabajo, concluyeron que cuando más del 50% de las células mononucleadas son positivas, el diagnóstico de TCG es muy probable⁵⁹.

Shooshtarizadeh agregó a esta observación el considerar no únicamente la proporción de células mononucleadas que son positivas, sino también el grado de positividad (ligero, moderado o intenso) para el uso de *p63* en el diagnóstico de los TCGs⁶⁰.

Posteriormente Yanagisawa et al., hicieron otro estudio en el que hicieron la observación de que aquellos casos de TCG intensamente positivos para *p63* con inmunohistoquímica, fueron los que presentaron recurrencias⁶¹.

Lau et al., sugirieron que *p63* participa en la regulación de genes específicos asociados en la progresión del ciclo celular, promoviendo la progresión de los TCGs al inhibir la actividad de *p53*⁶².

De acuerdo con estos datos, podemos concluir que hasta el momento la utilidad reportada de *p63* para el diagnóstico y pronóstico de los TCGs no está bien definida. Tabla 1.

CTSK

La catepsina K es una enzima que muestra semejanza con miembros de la familia de proteasas de cisteína de papaína (Familia C1), que incluye a las catepsinas S, L y B. Se descubrió en 1994 de forma simultánea por varios grupos independientes de investigadores, quienes la llamaron catepsina O2, catepsina X, catepsina O⁶³.

La catepsina K se expresa en los osteoclastos y se encuentra organizada en dímeros que contienen una zona de unión a glucosaminoglicanos, a través de los cuales se une a la colágena tipo I. A diferencia de las metaloproteasas (MMP) la catepsina K carece de un dominio específico para unirse con la colágena⁶⁴.

La acción colagenolítica de la catepsina K es ejercida en la parte más ácida de la resorción ósea que son las lagunas, cerca del borde en cepillo de los osteoclastos (Figura 4). Actúa a un pH de alrededor de 3.5 o 4.5 creado por la ATPasa transmembrana. A diferencia de la catepsina K, las colagenasas que contienen zinc -metaloproteasas- son más activas en un medio con pH neutro, localizado en la interfase entre la matriz desmineralizada y la mineralizada⁶⁵.

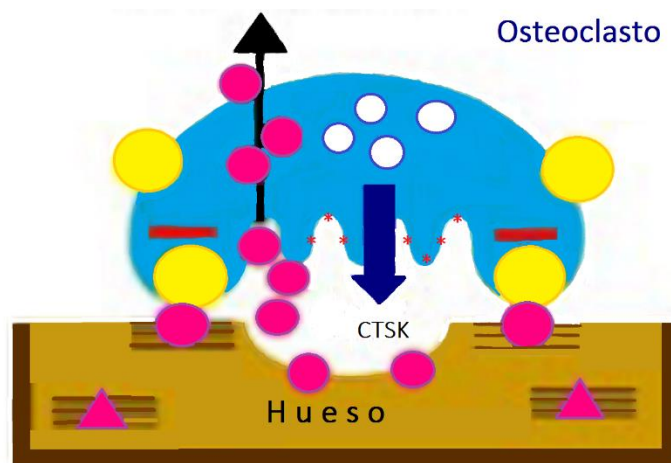


Figura 4. Fase de desmineralización y reabsorción ósea con secreción activa y abundante de catepsina K (CTSK) en la zona del borde en cepillo del osteoclasto(**) hacia la laguna ósea. Tomada de Wilson SR et al⁶⁰.

Posterior a su descubrimiento, en 1996, Drake et al., modificaron su nombre, llamándola catepsina K y la caracterizaron. En ese trabajo, se evaluó la expresión celular de la catepsina K en tejidos tales como sinovial y cabeza femoral con artritis reumatoide, riñón, bazo, hígado, pulmón, corazón, piel y colon, encontrándose en niveles mínimos o ausente en los tejidos comparados y sólo de forma abundante en los osteoclastos. Al hacer la determinación de las catepsinas S, L y B, que previamente habían sido propuestas como las involucradas en la reabsorción ósea en los osteoclastos, se observó que se encontraban ausentes en estos. La catepsina K se encontró localizada en la superficie celular de los osteoclastos adyacente al tejido óseo⁶⁶. Kafienah et al., determinaron en

estudios posteriores que la catepsina K no sólo es la responsable de degradar a la colágena tipo I, sino que también puede degradar a la colágena tipo II ⁶⁷.

Dodds et al., realizaron un análisis de inmunolocalización por hibridación in situ y citoquímico comparativo entre hueso normal y tejido proveniente de TCGs y describieron cómo la procatepsina K es procesada en el osteoclasto para dar lugar a la catepsina K. En su análisis especificaron que el procesamiento de la catepsina K ocurre antes de que se lleve a cabo la fijación de los osteoclastos a la superficie celular y la reabsorción del tejido óseo. Analizaron la expresión de catepsina K en los TCGs en diferentes zonas, ya fueran estas zonas de reabsorción ósea o zonas lejanas a los sitios de reabsorción. Y describieron que en las zonas lejanas a la reabsorción ósea los osteoclastos son de un tamaño más pequeño, siendo la expresión de mRNA de catepsina K muy variable, desde insignificante a moderada. Aquellos sitios de remodelación ósea en los TCGs mostraron expresión de la forma madura de la catepsina K. La expresión de catepsina K madura correlacionó directamente con la actividad enzimática detectada citoquímicamente. La expresión del mRNA fue mayor en los osteoclastos más grandes adyacentes al hueso ⁶⁸.

Lindeman et al., realizaron un estudio en 9 TCGs y encontraron que la proteasa expresada en forma más abundante en estos tumores es la catepsina K, siendo expresadas en mucho menor cantidad la catepsina L y la MMP-9. Además, mediante inmunohistoquímica determinaron la localización y el tipo celular en el que son expresadas estas proteasas, encontrando que la catepsina K y la MMP-9 se expresan exclusivamente en las células gigantes multinucleadas, mientras que la expresión de catepsina S y L únicamente en el otro componente de estos tumores que son las células mononucleadas (Figura 5).

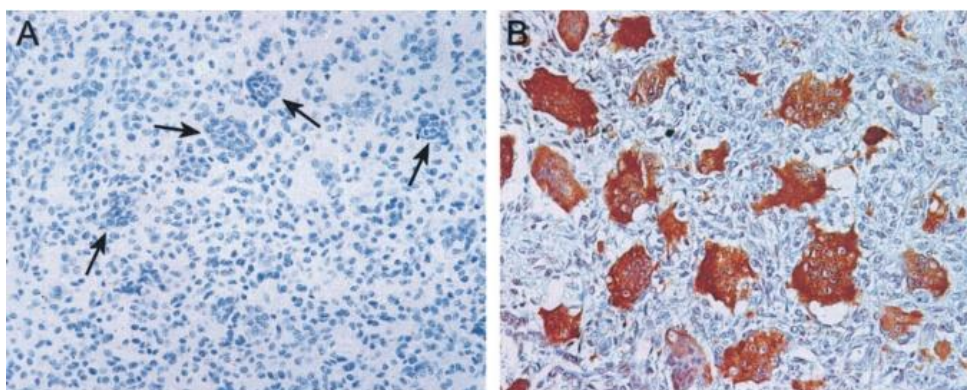


Figura 5: Tinción de inmunohistoquímica para catepsina K en TCG. **A)** Control negativo. Las flechas señalan células gigantes multinucleadas **b)** catepsina K positiva en células gigantes multinucleadas. Tomado de Lindeman et al⁶⁴.

Lindeman et al., proponen al sistema catepsina K / V-ATPasa como el principal responsable del potencial osteolítico del TCG, siendo así catepsina K la proteasa responsable de la extensa osteólisis observada radiológicamente⁶⁹.

De acuerdo a las observaciones de Lindeman⁶⁹ la inhibición de la catepsina K o de su bomba de protones asociada puede proporcionar nuevas oportunidades terapéuticas para el TCG.

Todos estos trabajos mencionados previamente, ponen de manifiesto la presencia de CTSK tanto en los osteoclastos, como en las células gigantes multinucleadas que forman parte de los tumores de células gigantes.

RANKL

RANKL forma parte, junto con RANK y OPG de la vía de señalización RANK descubierta a mediados de los 90s. RANKL es miembro de la superfamilia del TNF (factor de necrosis tumoral) y es producido por los osteoblastos, así como también por células inmunes y algunas células neoplásicas. La vía de señalización de RANK, conocida como RANKL/RANK/OPG es una vía de señalización clave en la remodelación ósea, y juega un papel crítico en la diferenciación de los precursores de osteoclastos en osteoclastos multinucleados y activación de los osteoclastos que conducen a la resorción ósea⁷⁰. En esta vía los osteoblastos y las células madre estromales expresan RANKL. Su receptor RANK se encuentra en la superficie de los osteoclastos y de sus precursores. En seguida la proteína adaptadora que se encuentra unida al dominio citoplasmático del receptor de RANKL, TRAF6, media la señal a través de la activación del factor de transcripción IKK. Posteriormente continúa la activación de otros factores de transcripción tales como NF- κ B y c-Fos, para finalmente llegar a NFATc1, quien puede además ser activado por la señalización calcio/calcineurina. NFATc1 promueve de manera activa la diferenciación de los osteoclastos. Figura 6.

En condiciones fisiológicas, RANKL se une a su receptor RANK en la superficie de los osteoclastos y estimula la reabsorción ósea a través de la osteoclastogénesis y la activación de osteoclastos maduros⁷¹. La OPG, secretada por los osteoblastos y células madre mesenquimales osteogénicas, protege al esqueleto de una reabsorción ósea excesiva uniéndose a RANKL e impidiendo que éste interactúe con RANK. La interacción balanceada entre RANKL y OPG es un punto importante para la osteoclastogénesis, remodelación ósea y masa ósea⁷².

La vía RANKL-RANK-OPG está involucrada en la patogénesis del TCG⁷³. *RANKL* es esencial para la diferenciación, función y supervivencia de los osteoclastos. Varios estudios informan que las células estromales del TCG expresan altos niveles de *RANKL*, considerado

un regulador de señal clave en el desarrollo de esta enfermedad⁷⁴. Se ha informado que las células estromales del TCG sobre expresan *RANKL*, estimulando de esta forma a los monocitos para formar células gigantes multinucleadas semejantes a osteoclastos, causando con esto una reabsorción ósea en el sitio del tumor⁷⁵.

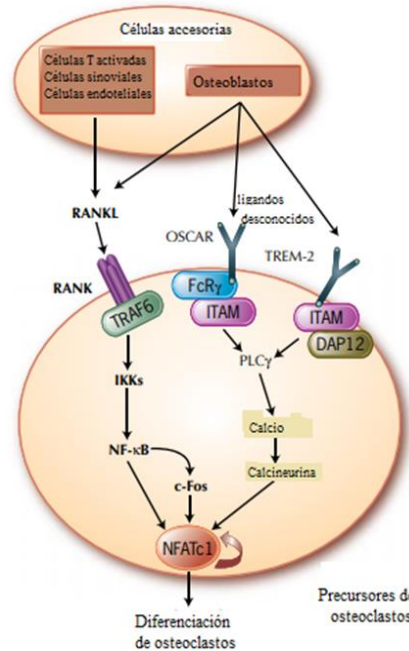


Figura 6: Las vías de señalización esenciales para la osteoclastogénesis en trastornos óseos. FcR γ - receptor Fc de la subunidad γ ; IKKs-inhibidores de NF-KB cinasa; ITAM-motivo de activación basado en inmunorreceptor de tirosina; NFATc1-factor nuclear de células T activadas c1; OSCAR-receptor asociado a osteoclastos; PLC γ - fosfolipasa C γ ; TRAF6- receptor del factor de necrosis tumoral asociado al factor 6; TREM- receptor desencadenante expresado en células mieloides. Tomado de B Boyce⁶⁴

La creación de un anticuerpo contra *RANKL*, como el denosumab, con la subsecuente inhibición de la diferenciación de los osteoclastos, es una alternativa terapéutica para aquellos pacientes con TCGs quirúrgicamente inaccesibles como los que se localizan en sacro o en columna vertebral ⁷⁶. Está demostrado que en aquellos pacientes que han completado el tratamiento con denosumab hay disminución o eliminación del dolor, presencia de bordes esclerosos, opacificación del tumor por radiología y ausencia de células gigantes multinucleadas. Por otra parte, el índice de proliferación de las células estromales disminuye al 50% en comparación con los pacientes no tratados⁷⁷. Sin embargo, también se ha reportado la presencia de efectos secundarios en los pacientes con tratamiento con denosumab como osteonecrosis mandibular, hipercalcemia⁷⁸ y osteosarcoma⁷⁹.

IHH

Indian Hedgehog (*IHH*) es una proteína que funciona como factor de señalización y forma parte junto con Sonic Hedgehog (*SHH*) y Desert Hedgehog (*DHH*), de la familia Hedgehog (*HH*). Esta familia tiene un papel fundamental en el desarrollo animal y se conserva filogenéticamente desde las moscas hasta los humanos. La señal de *IHH* se transduce uniéndose al receptor homólogo Patched 1 (*PTCH1*) y posteriormente a una proteína de dominio transmembrana llamada Smoothed (*SMO*), para finalmente controlar el procesamiento de los factores Gli (Gli 1 a 3) que a su vez regulan la expresión de otros genes que participan en la proliferación celular, reparación de DNA y/o apoptosis. En el cartílago en desarrollo, *IHH* es expresado principalmente por los condrocitos pre hipertróficos y también por los hipertróficos tempranos. *IHH* señala tanto a los condrocitos proliferativos como a los que se encuentran subyacentes a las células pericondriales^{80,81}.

Por otro lado, *IHH* forma parte de las señales extracelulares que regulan la diferenciación de los osteoblastos durante la osificación endocondral. En ausencia de *IHH*, las células mesenquimales localizadas en el pericondrio no pueden expresar *RUNX2*, que es indispensable para la diferenciación de osteoblastos.

El papel de *IHH* en la homeostasis ósea, durante la vida adulta, es diferente. Aquí *IHH* promueve la reabsorción ósea al señalar a los osteoblastos diferenciados promoviendo la expresión de PTHrP por parte de ellos, promoviendo a su vez la expresión de *RANKL* y la diferenciación de los osteoclastos. La pérdida de la señalización de *IHH* da como resultado un aumento de la masa ósea y una pérdida de hueso muy reducida. Esto sugiere que un aumento en la señalización de *IHH* es un evento clave en la osteoporosis y en todos aquellas patologías que se caracterizan por pérdida o lisis ósea⁸².

Al estudiar la expresión de *IHH* por inmunohistoquímica en diferentes tumores cartilagosos Park encontró su inmunolocalización en el citoplasma de las células neoplásicas y una mayor expresión en el condrosarcoma de células claras en comparación con los otros tipos de condrosarcomas⁸³. Por otro lado Horvai AE et al., estudiaron la expresión de diferentes factores de transcripción que participan en el desarrollo musculoesquelético, entre ellos *IHH*, en tumores de células gigantes y tumores osteoblásticos y cartilagosos tanto benignos como malignos⁸⁴. La expresión de *IHH* fue de moderada a fuerte en los osteosarcomas, rara en los condroblastomas y en los tumores de células gigantes se observó su expresión en un subconjunto de las células mononucleares (10% del volumen total de células) (Figura 7). En aquellos tumores entre cuyo componente histológico se encuentran células gigantes también se observó cierta tinción débil.

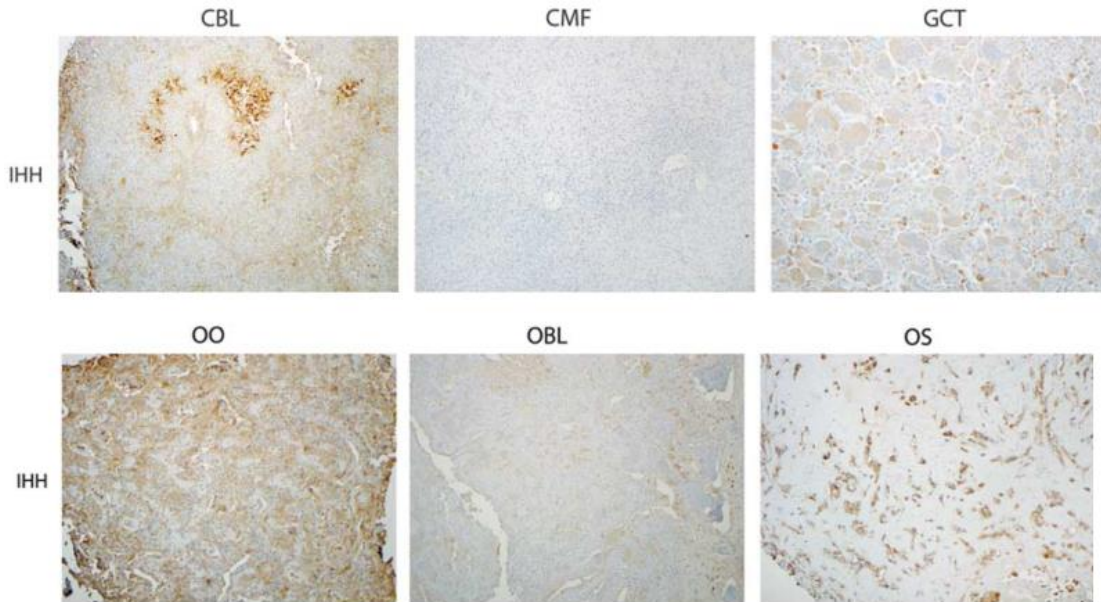


Figura 7: *IHH* mostró tinción nuclear y citoplásmica en la mayoría de las neoplasias osteoblásticas. En las neoplasias cartilaginosas como el CMF y CBL su tinción fue débil. En los Tumores de células Gigantes se observó tanto en células mononucleadas como en las multinucleadas, aunque débil. CBL, condroblastoma; CMF, fibroma condromixoide; GCT, tumor de células gigantes; OBL, osteoblastoma; OO, osteoma osteoide; OS, osteosarcoma. Tomado de Horvai et al⁷⁶.

En lo que respecta a la expresión de *IHH* en los tumores de células gigantes, es necesario realizar más estudios que confirmen o descarten las observaciones de Horvai.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Algunos estudios han reportado la expresión de *RANKL*, *IHH* y *CTSK*, *p53* y *p63* en TCGs, sin embargo, los resultados pueden llegar a ser contradictorios. No hay un estudio en población mexicana que los analice de manera conjunta en comparación con hueso sano del mismo individuo. Es necesario realizar nuevos estudios para determinar cuál es el nivel de expresión de estos genes en los TCGs y determinar su utilidad clínica en el manejo de los pacientes.

3. JUSTIFICACIÓN:

El estudio de la expresión de *p53*, *p63*, *RANKL*, *IHH* y *CTSK* en los tumores de células gigantes puede orientar hacia qué moléculas blanco dirigir futuras terapias en los TCGs ya que hasta la fecha únicamente existe una terapia dirigida contra una molécula blanco (*RANKL*).

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Existen diferencias en la expresión de *p53*, *p63*, *RANKL*, *CSTK* e *IHH* en tejido con tumor de células gigantes en comparación con tejido sin evidencia de tumor?

5. HIPÓTESIS

HIPÓTESIS NULA: No hay diferencias en la expresión de *p53*, *p63*, *CTSK*, *RANKL* e *IHH* entre el hueso sin tumor y con Tumor de Células Gigantes.

HIPÓTESIS ALTERNA: Existen diferencias en la expresión de *p53*, *p63*, *CTSK*, *RANKL* e *IHH* entre el hueso sin tumor y con Tumor de Células Gigantes.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe diferencia en la expresión de los genes *p53*, *p63*, *RANKL*, *IHH* y *CTSK*, mediante PCR en tiempo real, en tejido con tumor y sin tumor de células gigantes obtenidos del mismo individuo.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar en los productos de resección en bloque tejido con tumor de células gigantes y sin tumor de células gigantes por medio de improntas. Una vez identificadas estas zonas, obtener tejido en fresco, etiquetarlos y almacenarlos para su posterior uso.
2. Obtener RNA total.
3. Obtener cDNA por transcripción reversa.
4. Realizar PCR en tiempo real para determinar la cantidad de DNA amplificado de *p53*, *p63*, *CTSK*, *RANKL* e *IHH*.
5. Hacer un análisis comparativo de estos genes entre el tejido con tumor y el tejido sin tumor.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio:

Estudio transversal, descriptivo y analítico.

Universo de trabajo:

Pacientes del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra con diagnóstico de Tumor de Células Gigantes.

Unidades de observación:

Tejido tumoral: tejido con aspecto macroscópico de TCG, corroborado por impronta.

Tejido sin tumor: tejido óseo con aspecto macroscópico de hueso esponjoso, proveniente de la resección en bloque, en el que se corrobore la ausencia de tumor por impronta, obtenido del borde quirúrgico óseo.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Para toma de tejido

1. Pacientes con diagnóstico histológico de Tumor de Células Gigantes cuyo tratamiento consista en la resección en bloque del segmento afectado.
2. Pacientes que acepten participar en el estudio y hayan firmado el Consentimiento Informado (Ver Apéndice B).

Para PCR en tiempo real:

1. Muestras de ARN en las cuales tanto la razón 260/230 como la razón 260/280, ambas determinadas mediante espectrofotómetro sean iguales o mayores a 1.5. Ya que esto significa que estas muestras cuentan con un índice de pureza adecuado para seguir siendo consideradas en nuestro estudio.

Para el análisis estadístico:

2. Todas aquellas muestras de tumor de células gigantes que cuenten con su muestra pareja y/o contraparte (sin tumor).

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- 1.- Pacientes con diagnóstico de Tumor de Células Gigantes en los que se elija la resección en bloque como tratamiento pero que no firmen el Consentimiento Informado.
- 2.- Pacientes con diagnóstico de Tumor de Células Gigantes y con tratamiento diferente a la resección en bloque (curetaje, hipertermia hídrica controlada, etc.).

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN:

Para la toma de tejido

Pacientes con diagnóstico histológico de Tumor de Células Gigantes en los que como tratamiento se realice resección en bloque y en los que no haya sido posible (por fallas en la logística) obtener tejido en fresco o con tiempo de resección mayor a 1hr.

Para obtención de RNA total

Cantidad de tejido insuficiente: muestras de tejido de tamaño pequeño con peso menor a 30mg.

Para PCR en tiempo real

1. Muestras de RNA en las cuales tanto la razón 260/230 como la 260/280 determinadas por espectrofotómetro sean menores a 1.5
2. Muestras de RNA obtenidas de tejido con tumor que NO cuenten con su muestra pareja o contraparte (RNA de tejido sin tumor).

DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES DE ESTUDIO.

Variable dependiente: veces de cambio de la expresión del gen

Variable independiente: Presencia de tumor de células gigantes. Ver tabla 2

Tabla 2: Tipos de variables en el estudio y sus características

Variables de estudio	Tipo de Variable	Indicador
Veces de cambio en la expresión de un gen	Cuantitativa	Expresión relativa
Tipo de tejido	Cualitativa	Tejido con tumor, tejido sin tumor
Edad	Cuantitativa	Años
Sexo	Cualitativa	Femenino Masculino
Localización del tumor	Cualitativa	Fémur distal, tibia proximal, etc.
Metástasis pulmonares	Cualitativa	Si No
Tumor recurrente	Cualitativa	Si, no, número de recurrencia
Tiempo de evolución	Cuantitativa	Meses
Tamaño del tumor	Cuantitativa	Centímetros

TAMAÑO DE LA MUESTRA

CONSIDERACIONES:

La frecuencia de TCG al año en el Instituto Nacional de rehabilitación es de 31 casos al año (17% de los tumores óseos)⁵ y se realiza resección en bloque en el 33% de estos casos (10 casos al año).

Considerando que la fórmula para cálculo de tamaño de la muestra para comparación de dos medias, cuando los tamaños de los grupos a comparar son iguales es⁸⁵:

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 S^2}{d^2}$$

Donde

n = individuos necesarios en cada una de las muestras

Z_{α} = valor de Z correspondiente al riesgo α fijado, 5%

= 1.645 (en tablas)

Z_{β} = valor de Z correspondiente al riesgo β fijado, 90%

= 1.282 (en tablas)

S^2 = varianza de la distribución de la variable cuantitativa que se supone que existe en el grupo de referencia

= 2

d^2 = valor mínimo de la diferencia que se desea detectar

= 2 (2 veces de cambio)

$$n = \frac{2(1.645 + 1.282)^2 \cdot 2}{2^2} = 34.26/4 = 8.56$$

Por lo que para cada grupo se calculan 9 muestras en cada grupo.

Sin embargo, si tomamos como referencia el Artículo de Skubitz et al³²., en el que se determinó la expresión génica en 8 muestras de tumor de células gigantes y se comparó con tejido óseo sin tumor, correspondiente a osteoartritis; se considera también adecuado para este estudio contar con 8 muestras de tejido tumoral, así como también con 8 muestras de tejido sano.

MUESTREO:

Muestreo no probabilístico, a conveniencia.

Tiempo de recolección de la muestra: de junio 2016 a febrero 2017.

PROCEDIMIENTOS:

Técnica de la toma de muestras:

Una vez con el producto de resección en bloque en fresco, en el servicio de Anatomía Patológica, se procedió a realizar un corte sagital (Figura 8), quedando la pieza cortada en dos partes iguales. Se identificó macroscópicamente el borde quirúrgico óseo proximal (tejido óseo sin tumor), se realizó impronta de esta zona y una vez verificado histológicamente la ausencia de tumor, se tomaron 3 milímetros cúbicos de tejido, para posteriormente guardarlo a -80°C . Se identificó de igual forma tejido tumoral macroscópicamente y por impronta, y de esta zona se tomaron 3 milímetros cúbicos de tumor que fueron guardados a -80°C .



Figura 8: Ejemplo de resección en bloque de fémur distal con TCG. La flecha indica zona sin tumor, de la que se tomó para obtener posteriormente RNA. El asterisco indica zona de tejido con tumor, de la cual también se tomó tejido

Con este procedimiento se obtuvieron del mismo paciente 2 muestras: tejido con tumor de células gigantes y tejido sin tumor, las cuales fueron analizadas por pares, posteriormente.

Información clínica:

La fuente a partir de la cual se obtuvo la información clínica de los pacientes fue el expediente clínico electrónico (SAIH) del Instituto Nacional de Rehabilitación.

La información clínica de los pacientes se recolectó en una base de datos.

Obtención de RNA total de tejido óseo:

Para la obtención de RNA total el tejido se extrajo de su almacenamiento a -80°C y se seleccionó un tamaño adecuado (aproximadamente 30 mg) usando pinzas previamente tratadas con solución antiRNAsa. El fragmento de tejido se transfirió a un tubo de 1.5 ml y fue homogenizado utilizando un mortero. Posteriormente se agregó 1 ml de TRIzol y se mezcló. El homogenizado se centrifugó a 8600 rpm durante 15 segundos, para desechar los detritus del tejido. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml (previamente enfriado en hielo). Se incubó el sobrenadante 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 200ul de cloroformo. Se agitó vigorosamente por 15 segundos a mano. Se incubó 3 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12 000 rpm por 15 min a 4°C . La fase superior se transfirió a un tubo de 1.5 ml nuevo. A la fase superior se agregaron 1.5 volúmenes de isopropanol al 100%. Se incubó por 10 min. En seguida se centrifugó a 12 000 rpm por 10 min a -4°C . Se descartó el sobrenadante con pipeta. Se lavó el botón con 1 ml de etanol al 75%. Se agitó en el vórtex brevemente y centrifugó a 7500 rpm por 5 minutos. Se desechó el sobrenadante. El botón obtenido se dejó secar por 5-10 min a temperatura ambiente. Finalmente se suspendió en 30ul de agua destilada y se incubó a $55-60^{\circ}\text{C}$ por 10-15 min.

Control de calidad del RNA

Una vez realizada la extracción de RNA se determinó su pureza y concentración. Para comprobar su pureza, se midió por espectrofotometría la absorbancia a 260nm (A260), a 280nm (A280) y a 230nm (A230), ya que los ácidos nucleicos tienen su máximo de absorción a 260nm, las proteínas lo tienen a 280nm y las sales a 230nm; por lo tanto, viendo la relación entre ambas absorbancias (A260/280) y (A230/280) determinamos si nuestro RNA total extraído estaba puro o contaminado con restos de proteínas o sales. Tomando en consideración que el RNA tiene una absorbancia de 260 nm, se consideraron como aceptables los valores iguales o mayores a 1.5 para las razones 260/230 y 230/280

El RNA se almacenó a -80°C hasta su utilización.

Todos aquellos casos que no presentaron una relación de 260/230 y de 230/280 igual o mayor a 1.5, en los tejidos pareados, fueron eliminados.

RT-PCR

Para la transcripción inversa del RNA y obtener el cDNA se utilizó el TaqMan™ Reverse Transcription Kit, utilizando 900 ng de RNA total. Brevemente, en un tubo de 0.2ml se preparó la siguiente mezcla de reacción en un volumen total de 20µl, con:

0.6 µl de H₂O libre de RNA
2 µl de RT Buffer
1.4 µl de MgCl
4 µl de dNTP
1 µl de hexámeros aleatorios
1 µl de inhibidor RNA
1 µl de enzima MultiScribe™RT
9 µl de RNA

Se programó el termociclador de la siguiente manera: 9 minutos a 25°C, 30 min a 37°C, 5 min a 95°C y 30 min a 4°C. El cDNA obtenido se guardó a -20°C hasta el momento de llevar a cabo la PCR en tiempo real.

PCR en tiempo real

La cuantificación de la expresión de los genes de interés se realizó mediante PCR-tiempo real utilizando TaqMan Gene Expression Assay (Life Technologies), de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante. Se utilizó un termociclador StepOne Plus de Applied Biosystems. Las reacciones se prepararon de la siguiente manera:

Master Mix	4µl
Sonda TaqMan para el gen de interés	0.4 µl
cDNA	2µl
H ₂ O	1.6 µl
Volumen total	8 µl

La PCR consistió en 2 etapas, cada una de 2 pasos. El primer paso de la etapa uno (etapa de activación) consistió en 2 minutos de 50 grados, el segundo paso consistió en 10 minutos a 95 grados. La segunda etapa (etapa cíclica) consistió en 1) 15 segundos a 95 grados y 2) un minuto a 60 grados. Este último paso se repitió de forma cíclica durante 40 veces. Figura 9

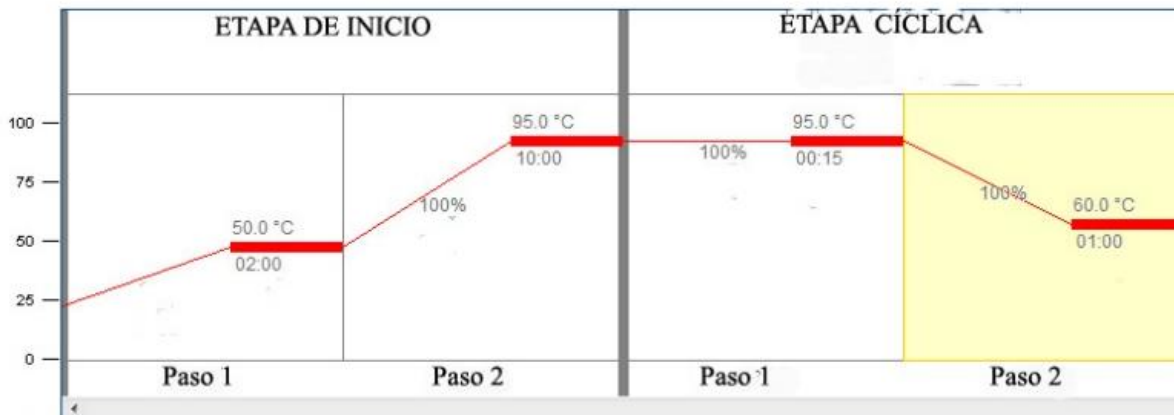


Figura 9: Esquema con los tiempos utilizados, temperaturas y etapas de la PCR en tiempo real

Como control endógeno se utilizó el gen *GADPH*. La cuantificación de la expresión génica relativa requiere utilizar, como controles endógenos, genes cuyo nivel de expresión sea constante, bajo determinadas condiciones experimentales. Se seleccionó una muestra correspondiente a tejido óseo sin tumor de células gigantes, como el tejido calibrador.

Cada una de las reacciones se llevó a cabo por triplicado. Se registró el número de ciclo, en la fase exponencial temprana, en el cual la fluorescencia emitida alcanza un umbral que es significativamente mayor que la fluorescencia de fondo (Ct). Se calculó el promedio de los tres valores de Ct considerando aquellos con una desviación estándar menor o igual a 0.05 Ver tablas A1- A5 en Apéndice A.

CÁLCULO DE EXPRESIÓN RELATIVA:

La cuantificación relativa se sustenta en la comparación entre el nivel de expresión del gen a estudiar contra un gen control (referencia endógena o normalizador) en un tejido control y uno con la condición de interés. Se utilizó el método Delta Delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), el cual presenta los resultados como cantidades en número de veces en el cambio de expresión de un gen con respecto a un calibrador (en este caso tejido no tumoral).

Paso 1: Cálculo del ΔCt

Se consideraron los siguientes valores del Calibrador: el Ct promedio del gen de interés (*p53*, *p63*, *RANKL*, *IHH* o *CTSK*) y el Ct promedio del gen control endógeno (*GADPH*). Se obtuvo ΔCt al substrair al Ct promedio del gen de interés el Ct promedio del gen endógeno. Es decir:

$$\Delta Ct = (\text{Ct de gen interés} - \text{Ct gen endógeno})$$

Este ΔCt obtenido del calibrador se utilizó para los posteriores cálculos del $\Delta\Delta Ct$.

Paso 2: Cálculo del $\Delta\Delta Ct$

Primero se calcula el $\Delta\Delta Ct$ del calibrador: se sustrae el valor del ΔCt de sí mismo, dando como resultado cero.

Para las otras muestras al ΔCt (Ct de gen interés – Ct gen endógeno) se resta el ΔCt obtenido del calibrador para obtener el $\Delta\Delta Ct$.

Es decir:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ de gen interés} - Ct \text{ gen endógeno}) - (\Delta Ct \text{ calibrador})$$

Paso 3: Para calcular las veces de expresión de un gen, con respecto al calibrador utilizamos

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Es decir, el resultado de elevar el número 2 a la potencia negativa del $\Delta\Delta Ct$, nos dará el número de veces de cambio de expresión del gen de interés, teniendo como referencia el calibrador.

Los resultados de estos cálculos están en las tablas A1 a A5 del Apéndice A.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los niveles de expresión entre el tejido sano y el tejido tumoral se compararon utilizando análisis de cuantificación relativa.

Cuantificación relativa: Método que analiza los cambios en la expresión de un gen en una condición de interés contra la condición control. Se selecciona un gen como referencia, cuya expresión no cambia en la condición de interés, para normalizar. La normalización con el gen endógeno corrige diferencias en el agregado de cDNA a cada tubo, variaciones de la muestra y variaciones cinéticas en la PCR.

En este estudio las condiciones a comparar fueron: 1) tejido óseo con tumor de células gigantes y 2) tejido óseo sin tumor de células gigantes. Nuestro gen de referencia fue *GADPH*. La expresión relativa de un gen se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Las diferencias significativas entre el tejido tumoral y sano, para los niveles de expresión, fueron evaluadas utilizando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney. Todas las pruebas se realizaron con un nivel de significancia del 95% ($p=0.05$) en el programa estadístico SPSS versión 22.

9. RESULTADOS:

Obtención de muestras y características clínicas de los pacientes:

Se obtuvo tejido con tumor y sin tumor de 23 pacientes, la mayoría provenientes del Distrito Federal, Hidalgo y Oaxaca. De estos 8 fueron mujeres y 15 fueron hombres (Figura 8). La edad promedio fue de 29 años. Las 3 localizaciones más comunes fueron en orden de frecuencia fémur distal, (8 casos, 34.8%), radio distal (6 casos, 26.1%) y húmero proximal (3 casos, 13%), Figura 9. El tiempo promedio de evolución fue de 11 meses, con un rango de cero a 48 meses. El síntoma más frecuente por el que acudieron al Instituto fue dolor en el sitio afectado, el 82% presentó discapacidad en la extremidad afectada. El 39% se encontraban asociados a quiste óseo aneurismático. Según la clasificación radiológica, la mayor parte de los casos (87%) fueron Campanacci III, es decir, correspondieron a tumores con destrucción de la cortical y extensión a tejidos blandos. No se presentó en este estudio ningún caso Campanacci I (tumor limitado al hueso, sin afectar a la cortical). En el 21% de los casos se reportaron implantes pulmonares en la Tomografía Pulmonar.

Frecuencia por sexo del Tumor de células gigantes

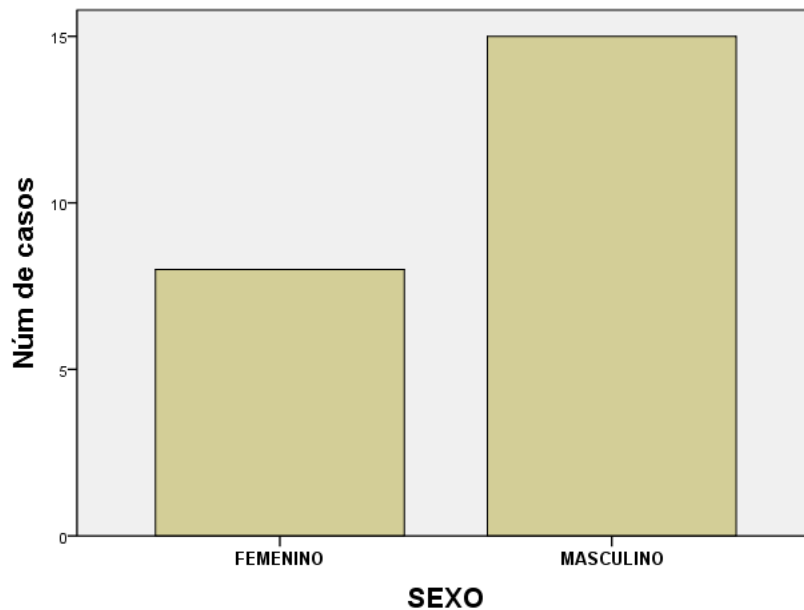


Figura 8: Frecuencia por sexo del Tumor de Células Gigantes

Localizaciones del Tumor de Células Gigantes

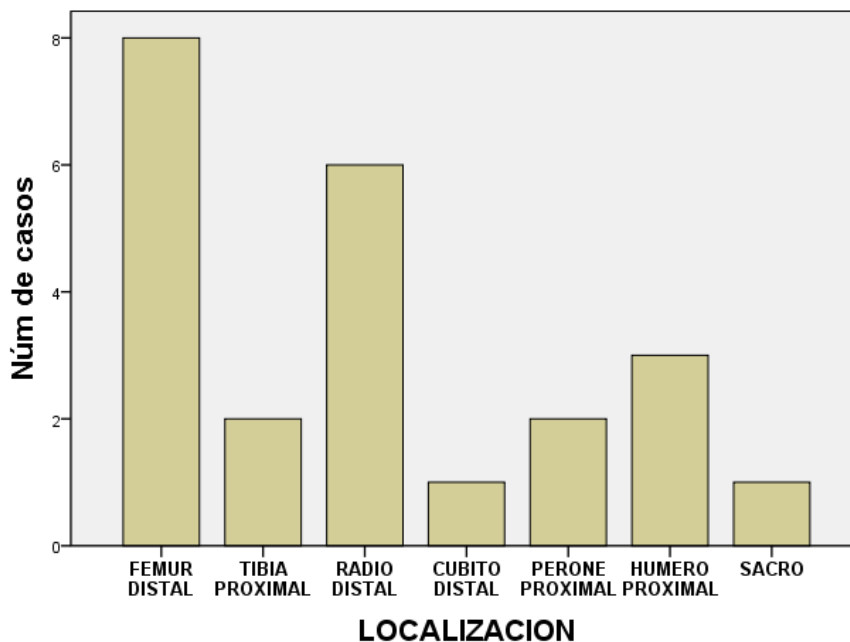


Figura 9: Regiones anatómicas afectadas por TCG en los pacientes de esta serie. Se observan fémur distal, radio distal y húmero proximal como las localizaciones más frecuentes

Obtención de RNA total de muestras:

En la siguiente etapa del estudio que fue la extracción de RNA se eliminaron 14 casos por las siguientes razones: 1) No contar con la cantidad de tejido necesaria para la obtención de RNA, 2) Ser un caso que no llegó a tener la pureza suficiente, es decir, un índice de 260/280 y 260/230 menor a 1.5 y/o 3) Ser un caso que no contaba con su tejido contraparte.

Quedando así con 18 muestras para realizar PCR en tiempo real (9 correspondientes a tejido con tumor y 9 correspondientes a tejido sin tumor, del mismo individuo). Estos 9 pacientes clínicamente no mostraron implantes pulmonares y correspondieron a TCG convencional sin asociación con quiste óseo aneurismático.

PCR en tiempo real:

Los resultados del ΔC_t se encuentran en las tablas A1 a A5 (ver Apéndice A).

Cálculo de la expresión relativa:

Las tablas con los cálculos y resultados de la expresión relativa (delta delta Ct) para cada uno de los genes de interés, se encuentran en el Apéndice tablas A1 a A5.

Análisis estadístico:

De cada uno de los genes de interés se obtuvo el delta delta Ct. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si los datos obtenidos presentaban una distribución normal y debido a que los datos no presentaron una distribución normal, se utilizó como medida de tendencia central la mediana y como medida de dispersión el rango.

Para determinar si las diferencias observadas en las medianas del delta delta Ct entre el tejido con tumor de células gigantes y sin tumor de células gigantes eran significativas se utilizó la prueba U de Mann Whitney.

Expresión relativa

La mediana para *p53* fue ligeramente mayor en el tejido sin tumor ($M_e=0.93$), en comparación con el tejido con tumor ($M_e=0.67$), sin ser esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.691$). La mediana para *p63* fue menor para el tejido sin tumor ($M_e=0.86$) y casi el doble de su valor en el tejido con tumor ($M_e=1.74$), aunque sin ser esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.2161$). Las diferencias estadísticamente significativas en las medianas se observaron en *RANKL*, *CTSK* e *IHH*, siendo mayores las medianas en el tejido con tumor para *RANKL* ($M_e=4.60$) y *CTSK* ($M_e=2.36$) y mayor la mediana de *IHH* en el tejido sin tumor ($M_e=9.40$). Ver Figura 10 y Tabla A6 en Apéndice A.

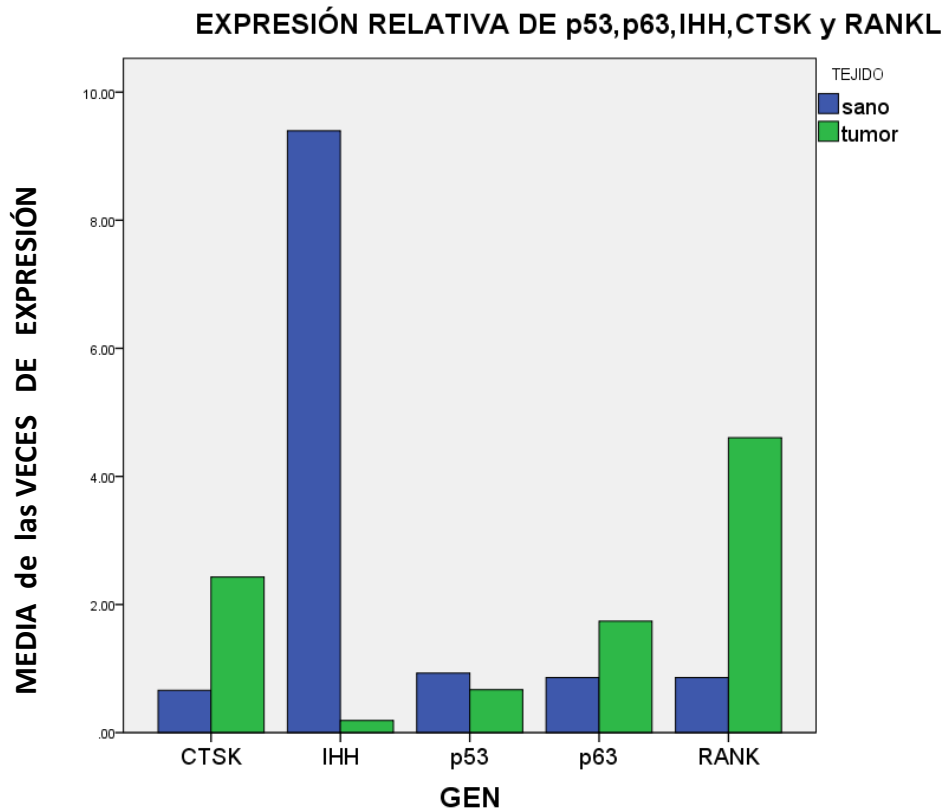


Figura 10: Expresión relativa de *p53*, *p63*, *IHH*, *CTSK* y *RANKL*

10. DISCUSIÓN:

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Al realizar una comparación de las características clínicas de los pacientes de los cuales se obtuvieron las muestras en este estudio con otras poblaciones, observamos semejanzas con respecto al promedio de edad de presentación (29 años). Sin embargo, observamos diferencias en cuanto a las localizaciones más frecuentes entre nuestros casos y otras series publicadas. Únicamente coincidió fémur distal como el primer lugar de localización y a diferencia de lo reportado en la literatura, tibia proximal no fue en nuestro estudio una de las localizaciones más frecuentes. Consideramos que una razón para observar esta diferencia podría ser que nuestro estudio contempla exclusivamente TCGs en los que se realizó resección en bloque. A diferencia de las series publicadas que contemplan a todos los TCGs en general, sin contemplar exclusivamente a aquellos sometidos a resección en bloque como lo es nuestro caso.

Otra de las diferencias observadas corresponde al género. Ya que en la literatura se reporta que, o hay un ligero predominio en el sexo femenino o, que no hay diferencia en cuanto al género más afectado. En este trabajo los TCGs evaluados fueron más frecuentes en el sexo masculino, con una relación hombre: mujer de 1.8:1. Esta característica coincide con un trabajo realizado previamente en el Instituto Nacional de Rehabilitación en el cual el TCG fue más frecuente en hombres que en mujeres⁵.

P53

Existen múltiples estudios que reportan la expresión de *p53* en los TCGs con gran variabilidad en los resultados. Existen estudios que no reportan expresión⁴⁰, y otros que reportan su expresión en un porcentaje muy variable que va del 12 al 79%⁴¹. Estos estudios no fueron comparativos con el tejido óseo normal, únicamente se buscó la expresión en el tejido tumoral. Dentro del espectro de comportamiento de los TCGs, se ha descrito que el 50% recurre, 5% da implantes pulmonares, 5% es maligno y un 40% corresponden a TCG convencional. Este espectro de comportamiento podría explicar las diferencias en la expresión reportada en otras series. Otra razón de la gran variabilidad podría deberse al método de detección empleado, en estos estudios se realizó inmunohistoquímica. Con esta técnica interviene la interpretación subjetiva del evaluador, las diferentes escalas de medición para la valoración de la intensidad en la tinción y la experiencia del interpretador.

La determinación de *p53* que se realizó en este trabajo no incluyó TCGs malignos ni recurrencias y sólo se llevó a cabo en tejido proveniente de TCGs primarios convencionales en los que el tratamiento inicial elegido fue la resección en bloque debido a fractura patológica. A pesar de que se encontró diferencia en la expresión entre el tejido

con tumor y el tejido sin tumor, ésta no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, los últimos estudios realizados para *p53* en los TCGs, coinciden en que éste es positivo en los TCGs malignos⁴⁵ y en el caso de los TCGs convencionales *p53* se expresa en el tejido correspondiente a las recurrencias o en aquellos tumores con riesgo a recurrir⁴⁷. Este dato es importante, porque abre la posibilidad de que *p53* sea utilizado como marcador pronóstico en los TCGs.

P63

Aunque hay estudios que apoyan el uso de *p63* en el diagnóstico de los TCGs⁵⁸, también existen otros estudios que detectan *p63* por inmunohistoquímica de igual forma en otros tipos de tumores óseos que contienen como componente histológico células gigantes multinucleadas. Estos hallazgos hacen dudar de su utilidad como marcador diagnóstico específico para TCG⁵⁶.

En este trabajo *p63* se expresó más en el tejido con TCG en comparación con el tejido sin tumor. Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Estos resultados, al igual que los obtenidos por otros autores como De la Roza⁵⁶, cuestionan su utilidad como marcador en el diagnóstico del TCG.

RANKL

La vía de señalización *RANKL/RANK/OPG* regula la formación y activación de los osteoclastos. En condiciones patológicas la sobreexpresión de *RANKL* da lugar a un aumento en la reabsorción ósea. En el caso de los TCGs, la sobreexpresión de *RANKL* por parte de las células estromales puede ser la responsable de la formación de numerosos osteoclastos y de la osteólisis por parte de estas células en los TCGs.

En este estudio *RANKL* mostró una sobreexpresión estadísticamente significativa en el tejido con tumor. Este resultado coincide con lo reportado en la literatura sobre la expresión de *RANKL* en los TCGs⁷⁴.

Sin embargo, aunque ya está en uso el tratamiento utilizando un anticuerpo contra *RANKL*, quedan varias preguntas por contestar como por ejemplo el determinar si existe una relación entre la cantidad de expresión de *RANKL* y la agresividad clínica (osteólisis) presente en los TCGs.

CTSK

El segundo gen que mostró sobreexpresión en los casos de este estudio fue *CTSK*, expresándose 2.36 veces más en el tejido con tumor. Este hallazgo nos hace considerar su posible uso como marcador. Además, apoya la propuesta de Lindeman⁶³ et al., quienes consideran que la inhibición de la catepsina K podría ser otra alternativa terapéutica de los TCGs. Para tal efecto es necesario conocer plenamente los mecanismos moleculares subyacentes que se llevan a cabo para que esta enzima degrade a la colágena tipo I. Aguda AH et al.⁸⁶ han descrito las características estructurales de la catepsina K y la serie de

eventos necesarios para que se lleve a cabo la degradación de la colágena tipo I. Dichos eventos son: 1) formación de dímeros de catepsina K, y 2) mediación de los glucosaminoglicanos en el anclaje de la catepsina K a la colágena. Aguda AH et al. proponen el bloqueo selectivo de la dimerización y/o de los sitios de interacción con los glucosaminoglicanos como alternativas terapéuticas específicas para la inhibir la actividad de colagenasa de la catepsina K.

En la actualidad se están utilizando, en ensayos clínicos, inhibidores de los sitios activos de la catepsina K, como el odanacatib, para el tratamiento de la osteoporosis⁸⁷.

IHH

Está descrito que *IHH* regula la diferenciación de los osteoblastos en la osificación endocondral. El único estudio previo al nuestro en el que se estudió la expresión de *IHH* en los TCGs, es el de Horvai⁸⁴. En ese estudio los tumores que fueron intensamente positivos por inmunohistoquímica fueron los osteoblásticos benignos y malignos, como los osteoblastomas, osteomas osteoides y osteosarcomas. Los TCGs fueron débilmente positivos en el núcleo y citoplasma de las células estromales. Sin embargo, en este trabajo el estudio comparativo se realizó entre diferentes tipos de tumores óseos, sin hacer una comparación con tejido óseo sano. Además de lo anterior, en el trabajo de Horvai no se hace mención de las características de los TCGs estudiados (primarios, recurrencias, con extensión a tejidos blandos, etc.).

Un aspecto de los resultados de este trabajo que llama la atención, es la diferencia en la expresión de *IHH* entre el tejido con tumor y sin tumor, encontrándose expresado a la baja en el tejido tumoral. Esto sugiere por un lado que *IHH* no es la vía de señalización que interviene en la osteólisis que se observa en los TCGs. Y por otro lado sugiere, de acuerdo a las observaciones realizadas previamente, que su expresión a la baja en los TCGs tiene como consecuencia una menor proliferación de osteoblastos y por ende una pérdida en el balance entre formación/resorción ósea. Dando lugar a un aumento en la osteólisis en el tejido tumoral.

Dificultades para la obtención del RNA

Una de las dificultades presentes en este trabajo fue la obtención de RNA de todas las muestras. Se reclutaron 20 pacientes y únicamente de 9 se pudo obtener RNA de la calidad adecuada. Atribuimos esta dificultad a factores como: 1) el tiempo transcurrido entre la resección en bloque y la obtención o almacenamiento de tejido, 2) la naturaleza del tejido óseo que requiere un mayor machacamiento, y 3) la fácil degradación del RNA. El tiempo transcurrido entre la resección en bloque y la toma de tejido para su posterior congelación fue una característica con muchas variaciones, siendo en algunos casos el momento de la obtención inmediato y en otros con varios minutos transcurridos. Al presentar el tejido óseo no tumoral zonas de consistencia dura y/o arenosa, requirió

mayor tiempo de machacamiento para la obtención de RNA. Esta manipulación de tejido prolongada pudo haber sido un factor en contra.

Limitaciones del estudio

Una de las limitaciones del estudio es la cantidad de casos estudiados. Aunque el TCG en el Instituto Nacional de Rehabilitación es el tumor óseo primario más frecuente, sólo en el 33% de los casos la resección en bloque es el tratamiento quirúrgico de elección. Esto nos dio un número reducido de piezas quirúrgicas para obtener tanto tejido con tumor como tejido óseo sin tumor del mismo paciente.

11. CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO:

CONCLUSIONES

En este trabajo se estudiaron TCGs primarios de hueso convencionales, sin historia de recurrencia, sin implantes pulmonares y sin datos histológicos de malignidad. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la expresión de *p53* y *p63* entre el tejido con tumor y el tejido óseo sin tumor. *RANKL* y *CTSK* se encontraron sobreexpresados en el tejido con tumor en comparación con el tejido sin tumor, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, *IHH* se encontró expresado a la baja en el tejido con tumor en comparación con el tejido óseo sano.

Este estudio cobra relevancia por dos razones. La primera es que no hay trabajos de este tipo reportados en la literatura en población mexicana. La segunda es que tampoco existen en la literatura trabajos en los cuales mediante PCR en tiempo real, se haya analizado la expresión relativa de *p53*, *p63*, *CTSK*, *RANKL* e *IHH* en tejido con tumor de células gigantes y tejido óseo sano del mismo paciente.

TRABAJO FUTURO

Durante el desarrollo de esta tesis han surgido algunas interrogantes que se han dejado abiertas y que pueden servir como líneas de investigación para retomarlas posteriormente; algunas de ellas son cuestiones que no fueron el objetivo de esta tesis.

Como continuación de esta investigación algunos trabajos futuros que pueden desarrollarse son:

- 1) Verificar si la expresión encontrada de nuestros genes de interés por PCR en tiempo real correlaciona con la cantidad de proteína presente en el tejido, utilizando la técnica ELISA para cuantificación de proteína.
- 2) Realizar inmunohistoquímica en los casos estudiados, con anticuerpos para *p53*, *p63*, *CTSK*, *RANKL* e *IHH* y determinar si existe alguna correlación entre los hallazgos obtenidos por inmunohistoquímica y los obtenidos en este estudio.

- 3) Llevar a cabo este mismo estudio en tejido proveniente de recurrencias de TCG para determinar si existe alguna diferencia en la expresión de nuestros genes de interés entre el tumor primario y la recurrencia.
- 4) Debido a que hay pacientes que no sólo presentan una recurrencia, sino varias (2 a 4 recurrencias), determinar si existe alguna variación en la expresión de estos genes de acuerdo al número de recurrencia.
- 5) En aquellos pacientes con implantes pulmonares y en los que esté contemplado en su tratamiento la resección de la lesión pulmonar, determinar si existe alguna diferencia en la expresión entre el tumor primario y el implante pulmonar.

BIBLIOGRAFÍA

1. Edward F M. Giant-Cell Tumor of bone: an historical perspective. *Clin Orthop Relat Res.* 1980;(153):14-25.
2. Dahlin D. Giant cell Tumor. In: Thomas CC, ed. *Bone Tumors: General Aspects and Data on 6,221 Cases.* Springfield; 1978:66-75.
3. Niu X, Zhang Q, Hao L, Ding Y, Li Y. Giant Cell Tumor of the Extremity: Retrospective Analysis of 621 Chinese Patients from One Institution. *J Bone Jt Surg Am.* 2012;94-A(5):461-467. doi:10.2106/JBJS.J.01922.
4. Jain K, Sunila, Ravishankar R, et al. Bone tumors in a tertiary care hospital of south India: A review 117 cases. *Indian J Med Paediatr Oncol.* 2011;32(2):82-85. doi:10.4103/0971-5851.89778.
5. Estrada-Villaseñor EG, Linares-González LM, Delgado-Cedillo EA, González-Guzmán R, Rico-Martinez G. Prevalencia y características clínico-patológicas del tumor de células gigantes. *Acta Ortop Mex.* 2015;29(6):295-298.
6. DelaGarza-Montano P, Estrada-Villasenor E, Dominguez Rubio R, et al. Epidemiological aspects of osteosarcoma, giant cell tumor and chondrosarcoma musculoskeletal tumors - Experience of the National Rehabilitation Institute, Mexico City. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2015;16(15):6451-6455. doi:10.7314/APJCP.2015.16.15.6451.
7. W.F E. Giant cell tumor. In: *Musculoskeletal Tumor Surgery.* New York: Churchill-Livingstone; 1983:1435-1468.
8. Al-Ibraheemi A, Inwards CY, Zreik RT, et al. Histologic Spectrum of Giant Cell Tumor (GCT) of Bone in Patients 18 Years of Age and Below. *Am J Surg Pathol.* 2016;40(12):1. doi:10.1097/PAS.0000000000000715.
9. Rigollino AV, Fernando TS, Tanaka MH, Souza MM. Giant cell tumor locally advanced around the knee: treatment and literature review. *Rev Bras Ortop (English Ed.* 2017;52(4):473-478. doi:10.1016/j.rboe.2017.06.009.
10. Cao H, Lin F, Hu Y, et al. Epidemiological and Clinical Features of Primary Giant Cell Tumors of the Distal Radius: A Multicenter Retrospective Study in China. *Sci Rep.* 2017;7(1):9067. doi:10.1038/s41598-017-09486-6.
11. Ji T, Yang Y, Wang Y, Sun K, Guo W. Combining of serial embolization and denosumab for large sacropelvic giant cell tumor. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(33):e7799. doi:10.1097/MD.00000000000007799.

12. Saikia Kabul C, Bhuyan Sanjeev K AF and CD. Giant cell tumor of the metacarpal bones. *Indian J Orthop*. 2011;45(5):475-478. doi:10.4103/0019-5413.83957.
13. Knösel T, Werner M, Jung A, Kirchner T DH. Dedifferentiated chondrosarcoma mimicking a giant cell tumor. *Pathol Res Pr*. 2014;210(3):194-197. doi:10.1016/j.prp.2013.12.003.
14. Estrada EG, Ayala AG, Lewis V CB. Dedifferentiated chondrosarcoma with a noncartilaginous component mimicking giant cell tumor of bone. *Ann Diagn Pathol*. 2002;6(3):159-163.
15. Chetan A. Giant cell tumor of bone with secondary aneurysmal bone cyst. *Int J Shoulder Surg*. 2008;2(3):68. doi:10.4103/0973-6042.42582.
16. Verma V, Puri A, Shah S, Rekhi B, Gulia A. Giant Cell Tumor Developing in Paget ' s Disease of Bone : A Case Report with Review of Literature. *J Orthop CASE REPORTS*. 2016;6(4):103-107. doi:10.13107/jocr.2250-0685.594.
17. Wulling M, Engels C, Jesse N, Werner M, Delling G, Kaiser E. The nature of giant cell tumor of bone. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2001;127(8):467-474.
18. Cowan RW, Singh G. Giant cell tumor of bone: A basic science perspective. *Bone*. 2013;52(1):238-246. doi:10.1016/j.bone.2012.10.002.
19. Capanna R, FAbbri N BG. Curettage of giant cell tumor of bone. The effect of surgical technique and adjuvants on local recurrence rate. *Chir Organi Mov*. 1990;(75):206.
20. Osaka S, Toriyama M, Taira K, Sano S SK. Analysis of giant cell tumor of bone with pulmonary metastases. *Clin Orthop Relat Res*. 1997;(335):253-261.
21. Alberghini M, Kliskey K, Krenacs T, Picci P, Kindblom L, Forsyth R AN. Morphological and immunophenotypic features of primary and metastatic giant cell tumour of bone. *Virchows Arch*. 2010;456(1):97-103. doi:10.1007/s00428-009-0863-2.
22. Gong L, Liu W, Sun X, Sajdik C, Tian X, Niu X HX. Histological and clinical characteristics of malignant giant cell tumor of bone. *Virchows Arch*. 2012;460(3):327-334. doi:10.1007/s00428-012-1198-y.
23. Ma Y, Xu W, Yin H, Huang Q LT. Therapeutic radiotherapy for giant cell tumor of spine: a systemic review. *Eur Spine J*. 2015;24(8):1754-1760. doi:10.1007/s00586-015-3834-0.
24. Miller IJ, Blank A, Yin SM, McNickle A, Gray R, Gitelis S. A case of recurrent giant cell tumor of bone with malignant transformation and benign pulmonary metastases. *Diagn Pathol*. 2010;5:62. doi:10.1186/1746-1596-5-62.
25. Li X, Guo W, Yang Y, Wei R, DU ZY. [Surgical treatment for long bone giant cell tumor of extremity with pathologic fracture]. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2013;45(5):745-751. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0->

84905937654&partnerID=40&md5=f263a9f058c05ab048616cfb9cbba770.

26. Borkowska A, Goryń T, Pieńkowski A, et al. Denosumab treatment of inoperable or locally advanced giant cell tumor of bone. *Oncol Lett.* 2016;12(6):4312-4318. doi:10.3892/ol.2016.5246.
27. Campanacci M, Baldini N, Boriani S SA. Giant-cell tumor of bone. *J Bone Jt Surg Am.* 1987;69(1):106-114.
28. Jaffe HL, Lichtenstein L. PR. Giant cell tumor of bone: its pathological appearance, grading, supposed variants and treatmentNo Title. *Arch Pathol.* 1940;30:993-1031.
29. NG S. Malignancy, aggressiveness, and recurrence in giant cell tumor of bone. *Cancer.* 1980;46(7):1641-1649.
30. Lausten GS, Jensen PK, Schiodt T LB. Local recurrences in giant cell tumor of bone. Long-term follow up of 31 caseso Title. *Int Orthop.* 1996;20(3):172-176.
31. Larsson SE, Lorentzon R BL. Giant-cell tumor of bone. A demographic, clinical, and histopathological study of all cases recorded in the Swedish Cancer Registry for the years 1958 through 1968. *J Bone Jt Surg Am.* 1975;57(2):167-173.
32. Skubitz KM, Cheng EY, Clohisy DR, Thompson RC, Skubitz APN. Gene expression in giant-celltumors. *J Lab Clin Med.* 2004;144(4):193-200. doi:10.1016/j.lab.2004.06.005.
33. DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(5):2420-2424. doi:10.1073/pnas.76.5.2420.
34. Levine AJ, Oren M. NIH Public Access. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(10):749-758. doi:10.1038/nrc2723.The.
35. Sabapathy K. The Contrived Mutant p53 Oncogene—Beyond Loss of Functions. *Front Oncol.* 2015;5(December):1-8. doi:10.3389/fonc.2015.00276.
36. Kim MP, Zhang Y, Lozano G. Mutant p53: Multiple Mechanisms Define Biologic Activity in Cancer. *Front Oncol.* 2015;5(November):1-6. doi:10.3389/fonc.2015.00249.
37. Walerych D, Lisek K, Del Sal G. Mutant p53: One, No One, and One Hundred Thousand. *Front Oncol.* 2015;5(December). doi:10.3389/fonc.2015.00289.
38. Aubrey BJ, Strasser A, Kelly GL. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(5). doi:10.1101/cshperspect.a026062.
39. Papanastassiou I, Ioannou M, Pagagelopoulos PJ, Arealis G, Mihas C, Iakovidou I DN. p53 expression as a prognostic marker in giant cell tumor of bone: a pilot study. *Orthopedics.* 2010;12(33). doi:10.3928/01477447-20100329-15.

40. Pompetti F, Rizzo P, Simon RM, et al. Oncogene alterations in primary, recurrent, and metastatic human bone tumors. *J Cell Biochem.* 1996;63(1):37-50. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8891902.
41. Wu Y, Hsiu J, Lou Y, Xia Z, Somers KD. p53 protein accumulation and genetic alterations in human giant cell tumors of bone (osteoclastomas). 1997:1087-1092.
42. Masui F, Ushigome S, Fujii K. Giant cell tumor of bone: A clinicopathologic study of prognostic factors. *Pathol Int.* 1998;48(9):723-729. doi:10.1111/j.1440-1827.1998.tb03973.x.
43. Oda Y, Sakamoto A, Saito T, et al. Secondary malignant giant-cell tumour of bone: Molecular abnormalities of p53 and H-ras gene correlated with malignant transformation. *Histopathology.* 2001;39(6):629-637. doi:10.1046/j.1365-2559.2001.01275.x.
44. Gong L, Liu W, Sun X, et al. Histological and clinical characteristics of malignant giant cell tumor of bone. *Virchows Arch.* 2012;460(3):327-334. doi:10.1007/s00428-012-1198-y.
45. Okubo T, Saito T, Mitomi H, et al. P53 mutations may be involved in malignant transformation of giant cell tumor of bone through interaction with GPX1. *Virchows Arch.* 2013;463(1):67-77. doi:10.1007/s00428-013-1435-z.
46. Cheng DD, Hu T, Zhang HZ, Huang J, Yang QC. Factors Affecting the Recurrence of Giant Cell Tumor of Bone after Surgery: A Clinicopathological Study of 80 Cases from a Single Center. *Cell Physiol Biochem.* 2015;36(5):1961-1970. doi:10.1159/000430164.
47. Lujic N, Sopta J, Kovacevic R, Stevanovic V, Davidovic R. Recurrence of giant cell tumour of bone: role of p53, cyclin D1, β -catenin and Ki67. *Int Orthop.* 2016;40(11):2393-2399. doi:10.1007/s00264-016-3292-2.
48. Moll UM, Slade N. P63 and P73: Roles in Development and Tumour Formation. *Mol cancer Res.* 2004;2(July):371-386.
49. Su X, Chakravarti D FE. p63 steps into the limelight: crucial roles in the suppression of tumorigenesis and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(2):136-143. doi:10.1038/nrc3446.
50. Barton CE, Johnson KN, Mays DM, et al. Novel p63 target genes involved in paracrine signaling and keratinocyte differentiation. *Cell Death Dis.* 2010;1(9):e74-11. doi:10.1038/cddis.2010.49.
51. Han A, Li J, Li Y, et al. p63 a modulates c-Myc activity via direct interaction and regulation of MM1 protein stability. 2016;7(28):44277-44287.
52. Park HR, Kim YW, Park JH, Maeng YH, Nojima T, Hashimoto H PY. Low expression of

- p63 and p73 in osteosarcoma. *Tumori*. 2004;90(2):239-243.
53. Kallen ME, Sanders ME, Gonzalez AL, et al. Nuclear p63 expression in osteoblastic tumors. *Tumor Biol*. 2012;33(5):1639-1644. doi:10.1007/s13277-012-0419-y.
 54. Lee C-H, Espinosa I, Jensen KC, et al. Gene expression profiling identifies p63 as a diagnostic marker for giant cell tumor of the bone. *Mod Pathol*. 2008;21(5):531-539. doi:10.1038/modpathol.3801023.
 55. Dickson BC, Li S-Q, Wunder JS, et al. Giant cell tumor of bone express p63. *Mod Pathol*. 2008;2129:369-375. doi:10.1038/modpathol.2008.29.
 56. De La Roza G. P63 expression in giant cell-containing lesions of bone and soft tissue. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135(6):776-779. doi:10.1043/2010-0291-OA.1.
 57. Yanagisawa M, Okada K, Takahiro T, Torigoe T, Kawai A, Nishida J. A clinicopathological study of giant cell tumor of small bones. *Ups J Med Sci*. 2011;116(4):265-268. doi:10.3109/03009734.2011.596290.
 58. Hammas N, Laila C, Lamrani A, Hind E HRST and AA. Can p63 serve as a biomarker for giant cell tumor of bone? A Moroccan experience. *Diagn Pathol*. 2012;7(1):130. doi:10.1186/1746-1596-7-130.
 59. Maues De Paula A, Vasiljevic A, Giorgi R, et al. A diagnosis of giant cell-rich tumour of bone is supported by p63 immunohistochemistry, when more than 50 % of cells is stained. *Virchows Arch*. 2014;465(4):487-494. doi:10.1007/s00428-014-1637-z.
 60. Shooshtarizadeh T, Rahimi M, Movahedinia S. P63 expression as a biomarker discriminating giant cell tumor of bone from other giant cell-rich bone lesions. *Pathol Res Pract*. 2016;212(10):876-879. doi:10.1016/j.prp.2016.07.007.
 61. Yanagisawa M, Kakizaki H, Okada K, Torigoe T, Kusumi T. P63 as a prognostic marker for giant cell tumor of bone. *Ups J Med Sci*. 2013;118(1):23-28. doi:10.3109/03009734.2012.724731.
 62. Lau CPY, Ng PKS, Li MS, Tsui SKW, Huang L, Kumta SM. P63 regulates cell proliferation and cell cycle progression-associated genes in stromal cells of giant cell tumor of the bone. *Int J Oncol*. 2013;42(2):437-443. doi:10.3892/ijo.2012.1727.
 63. Brömme D OK. Biol Chem Hoppe Seyler. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1995;376(6):379-384.
 64. Panwar P, Du X, Sharma V, et al. Effects of cysteine proteases on the structural and mechanical properties of collagen fibers. *J Biol Chem*. 2013;288(8):5940-5950. doi:10.1074/jbc.M112.419689.
 65. Wilson SR, Peters C, Saftig P, Brömme D. Cathepsin K activity-dependent regulation of osteoclast actin ring formation and bone resorption. *J Biol Chem*. 2009;284(4):2584-2592. doi:10.1074/jbc.M805280200.

66. Drake FH, Dodds RA, James IE, et al. Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem.* 1996;271(21):12511-12516. doi:10.1074/jbc.271.21.12511.
67. Kafienah el, Bro D, Buttle DJ, Croucher LJ, Hollander AP. Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Biochem J.* 1998;331:727-732. doi:10.1042/BJ3310727.
68. Dodds RA, James IE, Rieman D, et al. Human osteoclast cathepsin K is processed intracellularly prior to attachment and bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2001;16(3):478-486. doi:10.1359/jbmr.2001.16.3.478.
69. Lindeman JHN, Hanemaaijer R, Mulder A, et al. Cathepsin K is the principal protease in giant cell tumor of bone. *Am J Pathol.* 2004;165(2):593-600. doi:10.1016/S0002-9440(10)63323-8.
70. Boyce BF, Xing L. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr Osteoporos Rep.* 2007;5(3):98-104. doi:10.1007/s11914-007-0024-y.
71. Silva I, Branco JC. Rank/RANKL/OPG: Literature review. *Acta Reumatol Port.* 2011;36(3):209-218.
72. Atkins GJ, Bouralexis S, Haynes DR, et al. Osteoprotegerin inhibits osteoclast formation and bone resorbing activity in giant cell tumors of bone. *Bone.* 2001;28(4):370-377. doi:10.1016/S8756-3282(01)00404-5.
73. Wu PF, Tang JY, Li KH. RANK pathway in giant cell tumor of bone: pathogenesis and therapeutic aspects. *Tumor Biol.* 2015;36(2):495-501. doi:10.1007/s13277-015-3094-y.
74. Roux S, Amazit L, Meduri G, Guiochon-Mantel A, Milgrom E, Mariette X. RANK (receptor activator of nuclear factor kappa B) and RANK ligand are expressed in giant cell tumors of bone. *Am J Clin Pathol.* 2002;117(2):210-216. doi:10.1309/BPET-F2PE-P2BD-J3P3.
75. Morgan T, Atkins GJ, Trivett MK, et al. Molecular profiling of giant cell tumor of bone and the osteoclastic localization of ligand for receptor activator of nuclear factor kappaB. *Am J Pathol.* 2005;167(1):117-128. doi:S0002-9440(10)62959-8 [pii].
76. Dufresne A, Derbel O, Cassier P, Vaz G, Decouvelaere A-V, Blay J-Y. Giant-cell tumor of bone, anti-RANKL therapy. *Bonekey Rep.* 2012;1(March):149. doi:10.1038/bonekey.2012.149.
77. Mak IWY, Evaniew N, Popovic S, Tozer R, Ghert M. A translational study of the neoplastic cells of giant cell tumor of bone following neoadjuvant denosumab. *J Bone Jt Surg - Am Vol.* 2014;96(15):1-8. doi:10.2106/JBJS.M.01332.
78. Uday S, Gaston CL, Rogers L, Parry M, Joffe J, Pearson J, Sutton D, Grimer R HW. Osteonecrosis of the jaw and Rebound Hypercalcemia in Young People treated with

Denosumab for Giant Cell Tumor of Bone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(2):596-603. doi:10.1210/jc.2017-02025.

79. Tsukamoto S, Righi A, Vanel D, Honoki K, Donati DM EC. Development of high-grade osteosarcoma in a patient with recurrent giant cell tumor of the ischium while receiving treatment with denosumab. *Jpn J Clin Oncol.* 2017;47(11):1090-1096. doi:10.1093/jjco/hyx112.
80. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 1999;13(16):2072-2086. doi:10.1101/gad.13.16.2072.
81. Long F, Ornitz DM. Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(1):1-20. doi:10.1101/cshperspect.a008334.
82. Mak KK, Bi Y, Wan C, et al. Hedgehog Signaling in Mature Osteoblasts Regulates Bone Formation and Resorption by Controlling PTHrP and RANKL Expression. *Dev Cell.* 2008;14(5):674-688. doi:10.1016/j.devcel.2008.02.003.
83. Park HR, Park YK. Differential expression of runx2 and Indian hedgehog in cartilaginous tumors. *Pathol Oncol Res.* 2007;13(1):32-37. doi:Paor.2007.13.1.0032.
84. Horvai AE, Roy R, Borys D, O'Donnell RJ. Regulators of skeletal development: a cluster analysis of 206 bone tumors reveals diagnostically useful markers. *Mod Pathol.* 2012;25(11):1452-1461. doi:10.1038/modpathol.2012.110.
85. Argimon Pallás JJV. METODOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA Y EPIDEMIOLOGICA. In: 3a edición. España: Elsevier.
86. Aguda AH, Panwar P, Du X, Nguyen NT, Brayer GD, Brömme D. Structural basis of collagen fiber degradation by cathepsin K. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(49):17474-17479. doi:10.1073/pnas.1414126111.
87. Khosla S, Clinic M, Hofbauer LC, Diseases B. HHS Public Access. 2018;5(11):898-907. doi:10.1016/S2213-8587(17)30188-2.Osteoporosis.

APÉNDICE

Apéndice A:

Tabla A1. Cuantificación Relativa de *p53* en Tejido con tumor y sin tumor.
Método $\Delta\Delta Ct$

Tejido	P53 Media Ct	GADPH Media Ct	ΔCt P53-GADPH	$\Delta\Delta Ct$ $\Delta Ct - \Delta Ct_{\text{Calibrador}}$	Expresión veces
Calibrador	32.20	29.74	2.56	0.00	1
T4	23.06	19.93	3.13	0.57	0.67
T6	27.28	24.22	3.06	0.50	0.71
T9	23.00	29.57	-6.57	-9.13	560.28
T11	23.86	17.78	6.08	3.52	0.09
T14	24.83	24.03	0.80	-1.76	3.39
T16	25.02	20.28	4.74	2.18	0.22
T20	25.12	20.72	4.40	1.84	0.28
T22	24.98	21.68	3.30	0.74	0.60
T23	26.20	24.70	1.50	-1.06	2.08
S4	23.24	20.67	2.57	0.11	0.93
S6	33.07	28.08	4.99	2.53	0.17
S9	31.73	28.37	3.36	0.90	0.54
S11	27.57	26.07	1.50	-0.96	1.95
S14	24.59	23.63	0.96	-1.50	2.83
S16	30.25	28.26	1.99	-0.47	1.39
S20	31.06	29.93	1.13	-1.33	2.51
S22	23.60	20.22	3.38	0.92	0.53
S23	23.87	21.21	2.66	0.20	0.87

Tabla A2. Cuantificación Relativa de *p63* en Tejido con tumor y sin tumor.
Método $\Delta\Delta Ct$

Tejido	P63 Media Ct	GADPH Media Ct	ΔCt P63-GADPH	$\Delta\Delta Ct$ $\Delta Ct - \Delta Ct$ Calibrador	Expresión veces
Calibrador	34.65	29.74	4.91	0.00	1
T4	24.13	19.93	4.20	-0.71	1.64
T6	28.33	24.22	4.11	-0.80	1.74
T9	21.96	29.57	-7.61	-12.52	5873.48
T11	24.87	17.78	7.09	2.18	0.22
T14	25.97	24.03	1.94	-2.97	7.84
T16	23.81	20.28	3.53	-1.38	2.60
T20	26.37	20.72	5.65	0.74	0.60
T22	28.87	21.68	7.19	2.28	0.21
T23	27.14	24.70	2.44	-2.47	5.54
S4	25.75	20.67	5.08	0.17	0.89
S6	34.21	28.08	6.13	1.22	0.43
S9	33.24	28.37	4.87	-0.04	1.03
S11	32.61	26.07	6.54	1.63	0.32
S14	25.94	23.63	2.31	-2.60	6.06
S16	30.76	28.26	2.50	-2.41	5.31
S20	37.06	29.93	7.13	2.22	0.21
S22	27.64	20.22	7.42	2.51	0.18
S23	26.34	21.21	5.13	0.22	0.86

Tabla A3. Cuantificación Relativa de *RANKL* en Tejido con tumor y sin tumor.
Método $\Delta\Delta Ct$

Tejido	RANKL Media Ct	GADPH Media Ct	ΔCt RANKL-GADPH	$\Delta\Delta Ct$ $\Delta Ct - \Delta Ct$ Calibrador	Expresión veces
Calibrador	35.69	29.74	5.95	0.00	1
T4	25.15	19.93	5.22	-0.73	1.66
T6	28.28	24.22	4.06	-1.89	3.71
T9	24.95	29.57	-4.62	-10.57	1520.15
T11	23.70	17.78	5.92	-0.03	1.02
T14	24.32	24.03	0.29	-5.66	50.56
T16	25.68	20.28	5.40	-0.55	1.46
T20	24.10	20.72	3.38	-2.57	5.94
T22	26.93	21.68	5.25	-0.70	1.62
T23	28.19	24.70	3.49	-2.46	5.50
S4	28.25	20.67	7.58	1.63	0.32
S6	35.85	28.08	7.77	1.82	0.28
S9	34.33	28.37	5.96	0.01	0.99
S11	33.12	26.07	7.05	1.10	0.47
S14	26.47	23.63	2.84	-3.11	8.63
S16	22.87	28.26	-5.39	-11.34	2592.27
S20	35.10	29.93	5.17	-0.78	1.72
S22	25.76	20.22	5.54	-0.412	1.33
S23	27.62	21.21	6.41	0.46	0.73

Tabla A4. Cuantificación Relativa de *CTSK* en Tejido con tumor y sin tumor.
Método $\Delta\Delta CT$

Tejido	CTSK Media Ct	GADPH Media Ct	ΔCt CTSK-GADPH	$\Delta\Delta Ct$ $\Delta Ct - \Delta Ct$ Calibrador	Expresión veces
Calibrador	27.54	29.74	-2.20	0.00	1
T4	16.45	19.93	-3.48	-1.28	2.43
T6	20.96	24.22	-3.26	-1.06	2.08
T9	15.41	29.57	-14.16	-11.96	3983.99
T11	14.90	17.78	-2.88	-0.68	1.60
T14	18.27	24.03	-5.76	-3.56	11.79
T16	18.75	20.28	-1.53	0.67	0.63
T20	17.28	20.72	-3.44	-1.24	2.36
T22	18.78	21.68	-2.90	-0.70	1.62
T23	19.52	24.70	-5.18	-2.98	7.89
S4	20.71	20.67	0.04	-2.16	4.47
S6	28.16	28.08	0.08	2.28	0.21
S9	26.76	28.37	-1.61	0.59	0.66
S11	25.65	26.07	-0.42	1.78	0.29
S14	18.53	23.63	-5.10	-2.90	7.46
S16	31.51	28.26	3.25	25.25	0.00
S20	37.70	29.93	7.77	5.57	0.02
S22	18.29	20.22	-1.93	0.27	0.83
S23	18.91	21.21	-2.30	-0.10	1.07

Tabla A5 . Cuantificación Relativa de *IHH* en Tejido con tumor y sin tumor.
Método $\Delta\Delta Ct$

Tejido	IHH Media Ct	GADPH Media Ct	ΔCt IHH-GADPH	$\Delta\Delta Ct$ $\Delta Ct - \Delta Ct$ Calibrador	Expresión veces
Calibrador	34.93	29.64	5.19	0.00	1
T4	31.49	19.93	11.56	6.37	0.01
T6	26.21	24.22	1.99	-3.20	9.19
T9	33.47	29.57	3.90	-1.29	2.45
T11	29.10	17.78	11.32	6.13	0.01
T14	30.76	24.03	6.73	1.54	0.34
T16	32.00	20.28	11.72	6.53	0.01
T20	30.58	20.72	9.86	4.67	0.04
T22	24.34	21.68	2.66	-2.53	5.78
T23	25.04	24.70	0.34	-4.85	28.84
S4	28.18	20.67	7.51	2.32	0.20
S6	24.07	28.08	-4.01	-9.20	588.13
S9	34.41	28.37	6.04	0.85	0.55
S11	28.66	26.07	2.59	-2.60	6.06
S14	25.15	23.63	1.52	-3.67	12.73
S16	22.87	28.26	-5.39	-10.58	1530.73
S20	27.55	29.93	-2.38	-7.57	190.02
S22	25.55	20.22	5.33	0.14	0.91
S23	24.42	21.21	3.21	-1.98	3.94

Tabla A6. Expresión relativa de *p53*, *p63*, *RANKL*, *CTSK* e *IHH* en tejido sin tumor de células gigantes y con tumor de células gigantes

	<i>p53</i>	<i>p63</i>	<i>RANKL</i>	<i>CTSK</i>	<i>IHH</i>
TEJIDO SIN TUMOR					
Mediana	0.93	0.86	0.86	0.66	9.40
Rango (p25-p75)	0-54-1.95	0.32-1.03	1.39-488.60	0.35-1.6	0.21-1.70
TEJIDO CON TUMOR					
Mediana	0.67	1.74	4.60	2.36	0.19
Rango (p25-p75)	0.28-2.08	.6-5.54	1.63-39.4	1.62-7.89	0.17-7.48
	p=0.6911	p=0.2161	p=0.021	p=0.024	p=0.038

Apéndice B

Consentimiento Informado

Consentimiento informado para la participación voluntaria en la investigación médica titulada “**Determinación de la Expresión Génica de p53, p63, RANKL, IHH y CTSK en Tejido Tumoral y Sano de Pacientes con Diagnóstico de Tumor de Células Gigantes**”.

Sede: Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra (INR LGII)

Servicios y laboratorio en los que se llevará a cabo la investigación: Anatomía Patológica, Tumores Óseos y Genética

JUSTIFICACIÓN: En el Instituto Nacional de Rehabilitación los Tumores de Células Gigantes ocupan el 17% de los Tumores Óseos, siendo la lesión ósea más frecuente en el grupo de adultos jóvenes -20 a 39 años- además de ocupar el segundo lugar en frecuencia en el grupo de adultos maduros en el mismo instituto.

Los resultados obtenidos de la investigación médica contribuirán a entender la fisiopatología de los Tumores de Células Gigantes de Hueso.

OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN: A usted se le está invitando a participar en una investigación médica que tiene como objetivo estudiar mediante técnicas de biología molecular si hay diferencias en la expresión de ciertos genes entre el tejido proveniente de un Tumor de Células Gigantes de hueso y el hueso sin tumor.

Consentimiento:

A Ud. Se le está invitando a participar en la investigación médica “**Determinación de la Expresión Génica de p53, p63, RANKL, IHH y CTSK en Tejido Tumoral y Sano de Pacientes con Diagnóstico de Tumor de Células Gigantes**” a cargo de la Dra. Eréndira Georgina Estrada Villaseñor y el Dr. Alberto Hidalgo Bravo, médicos adscritos al Servicio de Anatomía Patológica y de Genética del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra (INR LGII).

Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido la investigación médica y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme este consentimiento, del cual se le entregará una copia firmada y fechada.

Afirmo que se me ha explicado que antes de dar mi autorización para participar en esta investigación, es necesario que yo lea este documento con anticipación al procedimiento quirúrgico al cual seré sometido, con la finalidad de NO tomar una decisión precipitada, así como para también poder aclarar las dudas que tenga. De igual forma afirmo que se me informó que en caso de NO desear participar en esta investigación, mi decisión no demeritará de ninguna manera la calidad de atención que reciba en el Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra.

De igual forma confirmo que se me ha explicado en detalle en qué consiste la investigación, la justificación y el objetivo de ésta, así como también la forma en la que yo participo en ella que es dando mi autorización para que después de que se me haya resecado el Tumor de Células Gigantes, se utilice un fragmento pequeño tanto de tumor como de tejido sin tumor (de aproximadamente 3 por 3 milímetros cada uno) para los fines de la investigación. La toma de tejido se realizará posterior a la resección quirúrgica y no implica ningún tipo de riesgo o molestia hacia mi persona, ni podría generar complicaciones en mi estado de salud.

Se me han explicado los riesgos de la participación en la investigación médica y que sólo el personal involucrado en la investigación médica tendrá acceso a mis datos personales y a las muestras que sean colectadas. 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 bloqueada y sólo algunos miembros autorizados del equipo de investigación tendrá acceso al código de identificación.

Acepto que las muestras colectadas formen parte de un banco de muestras resguardado en el Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra y que podrán ser utilizadas por los investigadores involucrados en la investigación médica, para futuros estudios que persigan una meta en común a la presente investigación médica siempre y cuando estas investigaciones posteriores se encuentren autorizadas por el Comité de Investigación y el Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra.

Queda entendido que acepto que los diferentes resultados de los análisis moleculares podrán ser publicados, sin darse a conocer la identidad de los participantes (en este caso la mía), en revistas de difusión científica y que de momento estos resultados no tienen utilidad en la asistencia médica, siendo su única utilidad la de contribuir al conocimiento en este tema.

Comprendo que por mi participación el único beneficio que podría obtener es el de contar con información completa y actualizada sobre el Tumor de Células Gigantes correspondiente a las diferentes áreas que están involucradas en esta investigación, ya que recibiré el mismo tratamiento que el resto de los demás pacientes y no seré sometido a algún tipo de tratamiento alternativo y/o complementario por mi participación.

De igual forma se me ha aclarado que por mi participación no recibiré compensación económica alguna.

Se me ha informado que me encuentro en libertad de retirar mi consentimiento en cualquier momento sin dejar por esta razón de continuar recibiendo en el Instituto Nacional de Rehabilitación los cuidados, atención y tratamiento que requiero.

INFORMACIÓN GENERADA DURANTE LA INVESTIGACIÓN MÉDICA

Se me ha comunicado que en caso de ser de mi interés la información generada durante la investigación médica, puedo solicitarla a la Dra. Eréndira Georgina Estrada Villaseñor, quien es la investigadora responsable, al teléfono 59 99 1000 ext. 19101 o 19102.

Se me ha expresado que cuento con la garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos y beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación. Para lo cual podré ponerme en contacto con la Dra. Eréndira Georgina Estrada Villaseñor quien se encuentra en el Servicio de Patología (PB de la Torre de Investigación. Teléfono 59 99 1000 ext. 19101) de 8 a 16 horas o con el Dr. Alberto Hidalgo Bravo quien se encuentra en el Laboratorio de Genética (3er piso de la Torre de Investigación. Teléfono 59 99 1000 ext. 19401) de 8 a 16 horas.

En caso de duda sobre mis derechos, podré consultar al Comité de Ética en Investigación del INRLGII, teléfono 59 99 1000 ext. 18342

Acepto participar voluntariamente:

Nombre del paciente _____

Firma del paciente o de su Representante Legal (o huella digital en caso necesario):

Testigo 1

Testigo 2

Firma

Firma

Nombre

Nombre

Relación con sujeto de investigación.

Relación con sujeto de investigación

Esta parte debe ser llenada por el Investigador responsable:

He explicado al Sr. (a) _____ la naturaleza y los propósitos de esta investigación médica, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación y he contestado a sus preguntas.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador.

Fecha: _____

El presente Consentimiento Informado se extiende por duplicado, con un ejemplar para el participante y un ejemplar para el investigador responsable.