



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
SECRETARIA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE  
REHABILITACIÓN  
Luis Guillermo Ibarra Ibarra  
ESPECIALIDAD EN:

**GENÉTICA MÉDICA**

**“ANÁLISIS DE LA VÍA  
MYC/MAX EN TEJIDO ÓSEO  
DERIVADO DE  
OSTEOSARCOMA”**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE  
MÉDICO ESPECIALISTA EN:

**GENÉTICA MÉDICA**

**P R E S E N T A:**

**JOSÉ DE JESÚS VÁZQUEZ  
MONTANTE**

PROFESOR TITULAR

**DR. MARGARITA VALDÉS FLORES**

TUTOR DE TESIS

**DR. ALBERTO HIDALGO BRAVO**



Ciudad de México

Febrero 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Contenido

Agradecimientos.....	1
Resumen.....	2
Introducción.....	4
Epidemiología.....	4
Presentación Clínica.....	5
Diagnóstico.....	7
Histología.....	9
Clasificación.....	10
Estatificación.....	11
Tratamiento.....	14
Prospectiva de tratamientos.....	16
Pronóstico y sobrevida.....	16
Patogénesis.....	18
Bases Genéticas.....	19
Mutaciones Conductoras a Cáncer.....	20
Superfamilia MYC bHLHZ.....	26
Planteamiento del problema.....	31
Pregunta de investigación.....	32
Justificación.....	33
Hipótesis.....	34
Objetivos.....	35
Metodología.....	36
Criterios de selección.....	37
Descripción de variables.....	39

Descripción de procedimientos.....	40
Reclutamiento de pacientes.....	40
Recolección de muestras del tejido.....	40
Extracción de RNA.....	41
Síntesis de cDNA.....	42
Perfiles de expresión MYC, MAX, $\Delta$ MAX y GAPDH.....	43
qPCR.....	44
Perfiles de expresión MYC, MAX, dMAX y GAPDH.....	44
Diseño y optimización de oligonucleótidos.....	44
Estandarización.....	46
Normalización.....	46
Eficiencia de la reacción.....	46
Cuantificación relativa.....	50
Análisis estadístico.....	51
Resultados.....	52
Datos clínicos.....	52
Curvas de disociación.....	54
Curvas de estandarización.....	59
Cuantificación relativa.....	61
Discusión.....	64
Conclusión.....	69
Referencias Bibliográficas .....	70
Anexos.....	82
Aspectos bioéticos y de bioseguridad.....	82
Carta de Consentimiento Informado (Pacientes mayores de 18 años).....	83
Carta de Consentimiento Informado (Pacientes menores de 18 años).....	87

## **Agradecimientos**

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi mas profundo y sincero agradecimiento a todas las personas que de forma directa participaron en la realización de este trabajo y a todas las personas que me apoyaron e impulsaron para poder culminar con trabajo.

A mi familia en especial a mis abuelos mi tía Blanca y a mi hermana Yolanda que me enseñaron que la única opción es el éxito y que para llegar a el hay que ser constates y trabajar duro. A mis ahora dos princesas que me impulsan para continuar completando mis metas y poder ser un ejemplo a seguir para ellas.

A mi asesor y gran amigo el Dr. Hidalgo por las múltiples enseñanzas y la paciencia que me ha tenido para realizar este proyecto. A Moni por que definitivamente los experimentos no tendrían los mismos resultados sin ella.

A los Doctores del servicio de genética por que además de fórmame como genetista siempre me hicieron sentir como en casa, valorado y apreciado.

A mis compañeros de la residencia, de todos y cada uno de ellos he aprendido muchas cosas.

A todos ellos, muchas gracias.

## Resumen

**Introducción:** El Osteosarcoma (OS) es la neoplasia ósea maligna mas frecuente. El mayor numero de casos se presenta en adolescentes. En etapas iniciales las manifestaciones clínicas son inespecíficas. El tratamiento actual para esta enfermedad es la combinación de quimioterapia neoadyuvante asociada a la resección quirúrgica de la lesión primaria y de las metástasis, posterior a esto se indica quimioterapia adyuvante. La sobrevivida a 5 años en los casos sin metástasis es del 70 – 80%. En caso de presentar metástasis o recaídas la sobrevivida a 5 años es menor al 20%. La etología y los mecanismos patogénicos que subyacen el desarrollo de OS son complejos. El genoma de la célula de OS es caótico y complejo, la tasa media de mutación ha sido estimada en 1.2 mutaciones por megabase. Los fenómenos de cromotripsis y kataegis son mecanismos frecuentemente observados en células con OS. Un grupo de especial interés es el estudio de genes conductoras de cáncer. Actualmente se han reportado aproximadamente 100 genes conductores a cáncer para OS. La desregulación de la expresión de los genes/proteínas de la superfamilia MYC bHLHZ ocurre en el 50% de los tumores. Esta desregulación se correlaciona frecuentemente con presentaciones agresivas, resistencia a tratamiento y mal pronóstico. El objetivo de este estudio fue analizar la expresión de MYC/MAX/ $\Delta$ MAX en tejido óseo derivado de OS en comparación con hueso sano.

**Metodología:** Se recolectaron 19 muestras de tejido óseo tumoral de pacientes con diagnóstico de OS, como tejido control se recolectó tejido sano adyacente del mismo paciente. Se realizó qPCR diseñada para la amplificación de los genes de interés. En ambos grupos se analizaron las expresiones relativas de MYC/MAX/ $\Delta$ MAX por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Se aplicó prueba de Wilcoxon a las veces de cambios, calculadas a partir de la expresión relativa de los genes de interés para cada una de las muestras de tejido con OS y sus controles sanos pareados.

**Resultados:** La expresión relativa de MYC en tejido óseo con OS fue mayor que en sus controles pareados, con una  $p= 0.0005$ , estadísticamente significativa. La expresión relativa de MAX en tejido óseo con OS fue mayor que en sus controles pareados, con una  $p= 0.0054$ , estadísticamente significativa. La expresión relativa de  $\Delta$ MAX en tejido óseo con OS fue mayor que en sus controles pareados, con una  $p= 0.021$ , estadísticamente significativa.

**Conclusión:** En este estudio mostramos la sobre expresión de MYC y MAX en tejido óseo con OS. La regulación directa de MYC ha sido previamente explorada sin tener el éxito esperado probablemente por lo complejo de su función e interacción. Más estudios funcionales son necesarios para analizar la expresión de MYC, MAX y  $\Delta$ MAX, así como de las moléculas que interviene en la regulación de su expresión como en el caso de hnRNPA1.

**Palabras Clave:** Osteosarcoma, MYC, MAX,  $\Delta$ MAX, Genes conductores

# Introducción

## Epidemiología

El osteosarcoma (OS) es el tumor maligno primario de hueso más frecuente. Tiene una incidencia mundial de 3.1 casos por millón de habitantes. Representa el 0.2% de los tumores malignos y hasta el 75% dentro de algunos grupos etarios (Ottaviani & Jaffe, 2009). Su incidencia presenta un comportamiento bimodal, el primer pico de incidencia se observa durante la adolescencia en la que se reporta de hasta 4.4 casos por millón de habitantes y el segundo en individuos de entre 25 y 60 años de edad (Ottaviani & Jaffe, 2009; Rickel et al., 2017). En cuanto a la distribución geográfica sólo hay evidencia de mayor número de casos en hombres afroamericanos y en población irlandesa. También se ha descrito una menor incidencia en hombres originarios de Suecia. El OS tiene una ligera predilección por el género masculino, relación H:M de 1.43:1 (Gianferante et al., 2017; Ottaviani & Jaffe, 2009).

En un estudio epidemiológico del Registro Histopatológico del Hospital de Ortopedia “Dr. Victorio de la Fuente Narváez”, perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social, se seleccionaron las biopsias provenientes de pacientes con diagnóstico histopatológico de tumores óseos y de partes blandas. En este estudio se incluyeron a muestras de pacientes de ambos sexos y cualquier edad diagnosticados entre los años de 2005 y 2014. La muestra fue de 4744 casos de tumores óseos y de partes blandas. Del total de los casos la incidencia relativa de OS reportada fue del 3.29%. Dentro del subgrupo de casos correspondientes con tumores óseos primarios, el OS representó el 7.06% de ellos. En 404 de los 4744 casos se concluyó que la tumoración correspondía a una neoplasia maligna de hueso, dentro de este subgrupo, el OS representó el 38.6% de los casos. La edad media de presentación descrita fue de 16 años. El

54.19% de los casos fue diagnosticado durante la segunda década de la vida y el género masculino representó el 60.9% de los casos (Rodríguez-Franco et al., 2016). En un segundo trabajo, en el que se analizaron las biopsias o resecciones iniciales de tumores óseos en el periodo comprendido de enero del año 2000 a diciembre del año 2005, en el servicio de anatomía patológica del Instituto Nacional de Rehabilitación. Se recolectaron un total de 566 muestras de pacientes con diagnóstico de tumor óseo primario. De las 566 muestras un 54% correspondió al género masculino con una relación hombre:mujer 1:1.6. La edad promedio de los pacientes fue de 25 años. De los casos analizados, 161 se catalogaron como tumores primarios de hueso malignos. De estos 161 casos, 75 (46.6%) correspondieron con OS, representando el 13.3% del total de los casos (Baena-Ocampo et al., 2009).

## **Presentación Clínica**

### *Cuadro clínico*

La presentación clínica del OS es inespecífica (Durfee et al., 2016). El dolor de la zona afectada es referido en el 90% de los pacientes (Gianferante et al., 2017). Este dolor es referido de predominio nocturno, asociado al aumento progresivo de volumen en la zona afectada sin poder determinar factores desencadenantes (Geller & Gorlick, 2010; Moore & Luu, 2014). En la exploración física se encuentra de manera frecuente una tumoración palpable, restricción del movimiento articular, dolor local asociado a la carga de peso y eritema localizado asociado en ocasiones a hipertermia (Durfee et al., 2016; Geller & Gorlick, 2010; Gianferante et al., 2017). Las fracturas patológicas son el motivo inicial de consulta en el 5-10% de los casos (Durfee et al., 2016; Moore & Luu, 2014). Los síntomas neoplásicos sistémicos (fiebre, sudoración

nocturna y pérdida de peso), tradicionalmente observados de forma temprana en la mayoría de las neoplasias, se presentan sólo en etapas avanzadas de la enfermedad (Durfee et al., 2016; Geller & Gorlick, 2010).

### *Topología*

La localización topológica más comúnmente afectada es la placa de crecimiento metafisiaria de los huesos largos (Ottaviani & Jaffe, 2009; Rickel et al., 2017). Hasta un 74.5% de los casos se presentan en los huesos largos de las extremidades inferiores. Dentro de los huesos de las extremidades inferiores el fémur se ve afectado en el 42% de los casos, en tres cuartas partes de estos casos la tumoración se localiza en la porción distal del fémur. Por su parte la tibia corresponde al 19% de los casos confinados a extremidades inferiores y de estos el 80% se encuentran localizados en su porción proximal. El húmero se describe como el 10% del total de los casos, en nueve de cada diez casos la tumoración se localiza en la porción distal del este hueso. (Moore & Luu, 2014; Ottaviani & Jaffe, 2009; Rickel et al., 2017)[1, 2, 8]. Algunas localizaciones menos frecuentes son la cadera (8%), mandíbula (8%) y por último, manos y pies (1%) (ElKordy et al., 2018; Moore & Luu, 2014; Ottaviani & Jaffe, 2009).

En la población mexicana se reporta que la topología más frecuentemente afectada son las estructuras óseas que conforman la rodilla, es decir fémur distal y tibia proximal, representando el 55.8% de los casos. (Baena-Ocampo et al., 2009; Rodríguez-Franco et al., 2016).

### *Metástasis*

Al momento del diagnóstico de OS es posible detectar la presencia de metástasis macroscópicas en el 10-20% de los casos y metástasis microscópicas hasta en un 80% de los casos (Durfee et al., 2016; Geller & Gorlick, 2010; Gianferante et al., 2017; Y. Zhang et al.,

2014). La vía de diseminación más frecuente es la hematológica (Geller & Gorlick, 2010; Y. Zhang et al., 2014). El órgano más frecuentemente afectado es el pulmón (75% metástasis) seguido por otros huesos (Durfee et al., 2016; Gianferante et al., 2017). La relevancia de detectar metástasis al momento del diagnóstico, radica en que es el marcador de pronóstico más importante. La supervivencia a 5 años disminuye desde el 70% hasta un 20% en presencia de metástasis (Geller & Gorlick, 2010; Gianferante et al., 2017; Y. Zhang et al., 2014).

### **Diagnóstico**

El diagnóstico y la estadificación oportunos son indispensables para una adecuada planeación de tratamiento, educación y orientación del paciente y sus familiares (Durfee et al., 2016).

En la actualidad, los estudios de laboratorio en sangre carecen de valor diagnóstico en OS. Algunos grupos recomiendan tener pruebas de referencia basales que incluyan al menos biometría hemática completa, colesterol de baja densidad, fosfatasa alcalina y lactato deshidrogenasa (Moore & Luu, 2014).

Los estudios de imagen son la piedra angular para el diagnóstico de OS (Durfee et al., 2016). La radiografía es el primer estudio a solicitar ante la sospecha de OS. Técnicas más sofisticadas, como la resonancia magnética (RM) y la tomografía axial computada (TAC), son de utilidad para delimitar la extensión, afección de partes blandas y detectar metástasis (Durfee et al., 2016).

Es necesario solicitar mínimo 2 proyecciones radiográficas del hueso afectado completo y la articulación adyacente. En las radiografías se observa una lesión de bordes mal definidos originada en la metafisis que puede presentar cambios osteoblásticos, osteolíticos o mixtos (Misaghi et al., 2018; Ritter & Bielack, 2010). Es frecuente observar calcificaciones en tejidos

blandos (patrón en parches). Se considera típica la formación triangular de una calcificación perióstica entre el tejido tumoral y el tejido sano, a esta imagen se le conoce como triángulo de Codman (Durfee et al., 2016; Ritter & Bielack, 2010).

Ante un paciente en el cual se tiene sospecha de OS, apoyado con evidencia radiográfica, es necesario solicitar una resonancia magnética (RM) de la región afectada, una tomografía axial computada (TAC) de tórax y una tomografía por emisión de positrones (PET) (Moore & Luu, 2014).

La RM tiene la capacidad de delimitar la extensión del tumor, afección de tejidos blandos, estructuras neurovasculares, invasión intramedular, metástasis por contigüidad y zonas circundantes incluidas las articulaciones (Misaghi et al., 2018; Moore & Luu, 2014; Ritter & Bielack, 2010). Por lo tanto, la RM es importante para determinar la extensión de la lesión, otorgar una estadificación y plantear un adecuado plan quirúrgico (Ritter & Bielack, 2010).

La TAC de tórax es el estándar de oro para la valoración de involucro pulmonar (Moore & Luu, 2014). Por ser un factor pronóstico es indispensable su realización para descartar la presencia de micrometástasis pulmonares. Se recomienda realizarla al diagnóstico de OS y para el seguimiento (cada 6-12 semanas) en todos los pacientes (Geller & Gorlick, 2010; Misaghi et al., 2018; Moore & Luu, 2014). En la valoración de la lesión carece de ventajas sobre la RM a no ser que se requiere valorar la integridad de la cortical o la presencia de fractura (Misaghi et al., 2018).

La técnica de PET es la herramienta más recomendada para realizar un rastreo óseo. Las células neoplásicas del OS presentan metabolismo y recambio óseo aumentado, por esta

cualidad presentan una mayor captación de tecnecio. Las lesiones son observadas en tejido óseo y no óseo como zonas hipercaptantes (Moore & Luu, 2014).

Existen otras técnicas de imagen adicionales como la RM de contraste dinámico (Geller & Gorlick, 2010; Moore & Luu, 2014). Su finalidad es aportar información adicional que se puede correlacionar con subtipos histológicos, angiogénesis o con la gravedad de la enfermedad (Geller & Gorlick, 2010; Misaghi et al., 2018; Moore & Luu, 2014). Sin embargo, su rol en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento aún está en proceso de determinación y validación (Moore & Luu, 2014).

### **Histología**

Cuando se tiene sospecha de OS, es indispensable la toma de biopsia para la confirmación del diagnóstico (Durfee et al., 2016)[6]. Es importante recalcar que la realización de la biopsia debe ser sustentada por los estudios de imagen (Moore & Luu, 2014). Por el amplio espectro histológico, la baja incidencia de la enfermedad y la importancia para la clasificación se recomienda su realización en un centro especializado (Moore & Luu, 2014; Ritter & Bielack, 2010).

Por definición el OS es un tumor maligno conformado por células de tejido conectivo, de origen mesodérmico, con la capacidad de generar material osteoide. La producción de matriz por las células de OS es variable y puede ser de naturaleza osteoide, cartilaginosa y fibrosa. (Klein & Siegal, 2006).

## **Clasificación**

El OS presenta un comportamiento heterogéneo, por lo que se subdividen según sus características histopatológicas. Es de especial interés conocer los diferentes subtipos ya que cada uno de ellos muestra una historia natural, un comportamiento o una respuesta al tratamiento diferente (Misaghi et al., 2018; Moore & Luu, 2014). Si bien esta clasificación es de gran utilidad, también representa un reto para el personal encargado de realizar el diagnóstico histopatológico del OS (Misaghi et al., 2018).

El OS puede variar en sus características incluso dentro del mismo tumor o entre tumoraciones que tienen una localización diferente en el mismo paciente. La clasificación del OS es determinada por el patrón histológico predominante, la ubicación anatómica de la tumoración y grado de diferenciación (Tabla 1) (Klein & Siegal, 2006). Con respecto a la naturaleza de la matriz del OS se le puede dividir en: osteoblásticos, condroblásticos y fibroblásticos (si presenta >50% de un subtipo histológico) (figura X) (Klein & Siegal, 2006). Por otra parte, las tumoraciones se les clasifica en función a la región del hueso en la que se origina. Con respecto a esto, podemos encontrar los siguientes grupos: medulares o centrales (más comunes), los de la superficie del hueso, los confinados a la corteza y los extraóseos. Esto es de gran importancia ya que el origen se relaciona con el grado de malignidad tumoral. La última característica a tomar en cuenta para la clasificación del OS es el grado de diferenciación de las células tumorales. (Klein & Siegal, 2006).

Tabla1. Clasificación de los osteosarcomas con respecto a localización, grado de diferenciación celular y características de su matiz.

<b>Tipos de osteosarcomas</b>		
<b>Localización</b>	<b>Diferenciación</b>	<b>Subtipo</b>
<b>Central</b>	Alto grado	Convencional
		Telangiectásico
		Células pequeñas
		Epiteloide
		Osteoblastoma-like
		Condroblastoma-like
		Fibrohistiocítico
		Células gigantes
	Bajo grado	Fibrodisplasia-like
		Desmoplastico fibroma-like
<b>Superficie</b>	Alto grado	Peraosteal diferenciado
		De superficie de alto grado
	Intermedio	Periosteal
	Bajo grado	Paraosteal
<b>Intracortical</b>		
<b>Mandibular</b>		
<b>Extra esquelético</b>	Alto grado	
	Bajo grado	

## **Estadificación**

El propósito de la estadificación en oncología es proporcionar lineamientos para clasificar los tumores en función de su riesgo de recurrencia local y de presentar metástasis. Esto tiene como último objetivo establecer el tratamiento óptimo para cada paciente (Cates, 2018; Steffner & Jang, 2018).

Existen diferentes escalas de estadificación. Las dos más usadas son las propuestas por el Comité Estadounidense sobre Cáncer Articular (AJCC por sus siglas en ingles) y por la Sociedad de Tumores Musculoesqueléticos (MSTS por sus siglas en ingles) (Cates, 2018; Misaghi et al., 2018; Steffner & Jang, 2018).

Tabla 2. Escala de estadificación de la Sociedad de Tumores Musculoesqueléticos para sarcomas óseos.

<b>Sistema Enneking de Estadificación</b>			
<b>Etap a</b>	<b>Grado de diferenciación</b>	<b>Localización</b>	<b>Metástasis</b>
<b>I A</b>	Bajo	Intracompartamental	
<b>I B</b>	Bajo	Extracompartamental	
<b>II A</b>	Alto	Intracompartamental	
<b>II B</b>	Alto	Extracompartamental	
<b>III</b>	Cualquiera	Cualquiera	Presente

El sistema MSTS, también conocido como sistema Enneking, considera para la estadificación el grado histopatológico del tumor, la extensión del tumor con respecto al compartimiento anatómico de origen y la presencia de metástasis (Tabla 2) (Cates, 2018; Enneking et al., 1980; Misaghi et al., 2018; Steffner & Jang, 2018). El sistema AJCC da más relevancia a la histopatología tumoral, la presencia de ganglios y de metástasis (Tabla 3). El sistema AJCC, al incluir estos factores sumados a los originales del sistema Enneking, cuenta con una predicción de pronóstico más confiable (Cates, 2018; Edge et al., 2015; Steffner & Jang, 2018)]. A pesar de las ventajas que se refieren del sistema AJCC sobre el sistema MSTS, por su simplicidad y aplicación quirúrgica el sistema MSTS sigue siendo el más comúnmente usado (Cates, 2018; Steffner & Jang, 2018).

Tabla 3: estadificación para sarcomas óseos según el Comité Estadounidense sobre Cáncer

Articular

<b>Estatificación del Comité Estadounidense sobre Cáncer Articular para Sarcomas Óseos</b>					
Etapa	Tumor	Ganglios	Metástasis	Grado	Resumen de la etapa
<b>I A</b>	T1	N0	M0	G1 o GX	T1 bajo grado
<b>I B</b>	T2 o T3				T2 o T3 de alto grado
<b>II A</b>	T1			G2 o G3	T1 alto grado
<b>II B</b>	T2	T2 alto grado			
<b>III</b>	T3	T3 alto grado			
<b>IV A</b>	C T		M1a	C G	Metástasis EN pulmón
<b>IV B</b>		N1	C M		Ganglio regional positivo
		C N	C 1b		Metástasis ósea o a distancia

**TX:** sin evidencia de tumor primario, **TX:** No es posible asignar un tumor primario  
**Tumores esqueleto apendicular:** T1: ≤ 8cm, T2: >8cm, T3: "lesiones por salto"  
**Tumores columna:** T1: 1 a 2 segmentos vertebrales adyacentes, T2: 3 segmentos vertebrales adyacentes, T3: > 4 segmentos vertebrales adyacentes o no adyacentes, T4: invasión a canal medular (4a) o grandes vasos (4b), C T: Cualquier T  
**Tumores pélvicos:** GX: no es posible determinar grado, G1: Bien diferenciado (bajo grado), G2: moderadamente diferenciado (alto grado), G3: pobremente diferenciado (alto grado)  
**M0:** sin metástasis, M1: Metástasis en pulmón (M1a) o hueso o otra localización (M1b), C M: cualquier metástasis  
**N0:** sin ganglios positivos, N1: ganglio regional positivo, N1: ganglio regional positivo, CN: cualquier ganglio, T1: confinado a un segmento pélvico <8cm (T1a) o >8cm (T1b), T2: un segmento + extensión extra ósea (T2a) o dos segmentos sin extensión extra ósea <8cm (T2a) o >8cm (T2b), T3: afección de 2 segmentos + extensión extra ósea <8cm (T3a) o >8cm (T3b), T4: tres segmentos o cruce de la articulación sacroilíaca; SI afectación articular medial al neuroforamen sacro (T4a) o el revestimiento de los vasos ilíacos externos / tumor macroscópico en los vasos pélvicos mayores (T4b)

Dentro de las variedades histológicas el más frecuente (76.9%) es aquel de localización central, con un alto grado de diferenciación y de componente osteoblástico. El estadio IIB de la escala

de Enneking se observa en el 77.6% de los casos al momento del diagnóstico. (Cates, 2018; Steffner & Jang, 2018).

## **Tratamiento**

La terapia estándar recomendada para OS está constituida por quimioterapia neoadyuvante seguida de resección quirúrgica completa de la lesión primaria y las metástasis detectadas clínicamente y posteriormente el uso de quimioterapia adyuvante para el control de las metástasis microscópicas(Kager et al., 2017).

### *Tratamiento Médico*

Link et al. en 1991 publicaron los resultados de un estudio multicéntrico en el que se demostró por primera ocasión que el OS es un tumor quimiosensible (Link et al., 1991). Los tres agentes que se consideran de elección de la quimioterapia son doxorubicina, cisplatino y metotrexate en dosis altas (HDMTX) asociados a rescate con leucovorin (denominadas como MAP backbone) (Kager et al., 2017). Se encuentran en el mercado alternativas terapéuticas con indicaciones particulares. El uso de isofosfamida se recomienda en casos de recaída o refractarios a tratamiento inicial. La isofosfamida se puede incluir como tratamiento inicial en caso de no ser posible indicar HDMTX (Kager et al., 2017). Múltiples grupos de investigación han intentado encontrar nuevos esquemas terapéuticos, dentro de ellos el más importante es el denominado EURAMOS por sus siglas en inglés (Estudio Europeo/Estadounidense en Osteosarcoma). Algunas de las estrategias empleadas han modificado la dosis, duración y momento de la administración de los medicamentos estándar o han añadido nuevos agentes terapéuticos (Marina et al., 2016; Whelan et al., 2015). Todas estas estrategias han fallado en

mejorar la sobrevida de los afectados y se necesitan desarrollar nuevas estrategias de manera urgente para modificar el panorama del OS (Kager et al., 2017).

### *Tratamiento Quirúrgico*

Independientemente del tratamiento con quimioterapia, la resección quirúrgica de toda actividad tumoral evidente continúa siendo indispensable para obtener la remisión de la enfermedad y mejorar la sobrevida (Durfee et al., 2016). En función de la extensión de la lesión se puede proponer cirugía de recuperación de la extremidad o amputación completa en casos más avanzados (Durfee et al., 2016). Es importante mencionar que se debe extraer cualquier metástasis si su localización y la estabilidad del paciente lo permite. Todas las resecciones (lesión primaria y metástasis) se deben de realizar con bordes amplios con la finalidad de prevenir enfermedad residual (Durfee et al., 2016; SALAH et al., 2014). Las piezas quirúrgicas deben de ser examinadas para valorar la respuesta a la quimioterapia. Se considera buena respuesta cuando se encuentra una tasa de necrosis >90% y por consiguiente tendrán mejor pronóstico comparados con aquellos en los que se encuentre una pobre respuesta (tasa de necrosis <90%) (Durfee et al., 2016). Anteriormente se consideraba que era indispensable la amputación completa de la extremidad afectada. Múltiples autores han reportado que no hay una mayor recaída local si se utiliza un enfoque de recuperación de extremidad versus amputación completa (Grimer, 2005; X. Li et al., 2016; Marulanda et al., 2008)[2]. En la actualidad, en el 85% de los casos de OS apendiculares de alto grado es posible realizar su resección preservando la función de la extremidad (Grimer, 2005; Marulanda et al., 2008).

## **Prospectiva de tratamientos**

El mayor reto de la genómica del cáncer es identificar las alteraciones en el genoma de la célula que conducen a la transformación neoplásica. La farmacogenómica del cáncer pone especial interés en buscar mutaciones conductoras de cáncer que sean susceptibles de tratamiento. Esto puede ser con diferentes enfoques tales como diseñar medicamentos que puedan revertir o modificar el fenotipo celular o la identificación de mecanismos de farmaco-resistencia (Castillo-Tandazo et al., 2019; Kager et al., 2017)[19, 26].

La vía de mTOR es blanco de estudios por que interviene con procesos de proliferación, supervivencia y angiogénesis. Actualmente se están desarrollo fármacos que actúan a diferentes niveles de esta vía de señalización tales como Everolimus, Pazopanib y Sorafenib entre otros (Castillo-Tandazo et al., 2019; Durfee et al., 2016; Kager et al., 2017).

La terapia inmunológica es otra área en desarrollo. Se encuentra en estudio la activación de la vía Fas para promover apoptosis y la destrucción inmunomediada de las células tumorales. El inmunomodulador, MTP-PE, actúa aumentando la activación de macrófagos, es prometedor y se encuentra en fase III de investigación clínica (Castillo-Tandazo et al., 2019; Durfee et al., 2016; Kager et al., 2017).

## **Pronóstico y sobrevida**

La sobrevida de los pacientes con OS es pobre (20%) si el tratamiento es quirúrgico aunado o no a radioterapia (Abou Ali et al., 2019). Con la introducción de la quimioterapia en la década de los 80's se logró modificar la sobrevida a cinco años de un 20% hasta un 70-80%, esto en caso de no presentar evidencia de metástasis al momento del diagnóstico. En los casos que se detectan metástasis al diagnóstico el panorama es menos favorable, en este grupo se observa

una sobrevida a 5 años de 20-40%, a pesar del enfoque terapéutico. La resistencia a quimioterapia se ve en el 30% de los casos sin metástasis al momento del diagnóstico y en más del 80% si hay evidencia de metástasis (Chou & Gorlick, 2006; He et al., 2014). La recurrencia del OS se presenta del 30% al 50% de los casos en los que no se detectan metástasis y hasta en el 80% de los casos que si se detectan metástasis al momento del diagnóstico (Anderson, 2016; Tabone et al., 1994). En los casos de recurrencia posterior a la resección quirúrgica del tumor primario, la sobrevida es aproximadamente del 15% a 5 años (Abou Ali et al., 2019; Moore & Luu, 2014; Ritter & Bielack, 2010; Smeland et al., 2019).

Múltiples factores se han asociado al pronóstico del OS. Algunos de estos con mayor sustento para demostrar su valor pronóstico en el desarrollo de OS (Abou Ali et al., 2019; Moore & Luu, 2014). Dentro de los factores pronósticos positivos se describen: el bajo grado de diferenciación de las células tumorales, resecciones quirúrgicas con margen libre de enfermedad y una buena respuesta histológica a la quimioterapia (Moore & Luu, 2014). Los factores de riesgo negativos incluyen la presencia de tumores de gran tamaño, tumores localizados en el esqueleto axial, edad del paciente (peor pronóstico a mayor edad) y los OS secundarios a enfermedad de Paget o a otros tumores secundarios a radioterapia o como metástasis de los mismos (Moore & Luu, 2014)[8]. Abou Ali B et al. en 2019 realizaron un estudio retrospectivo en 38 pacientes con diagnóstico de OS, su análisis mostró que la localización fuera de extremidades inferiores, el grado de necrosis y una resección quirúrgica tardía de la lesión primaria (después de 4 semanas del diagnóstico) se asociaron con un peor pronóstico (Abou Ali et al., 2019). Smeland S et al. en 2019 presentaron los resultados de los datos asociados a los factores pronósticos de la base de datos ERAMOS-1. Este grupo reportó que los factores de mal pronóstico al

momento del diagnóstico son: presencia de metástasis y localización axial. Dentro de la clasificación histológica, los tipos telangiectásico y convencional no especificado se asociaron con un pronóstico favorable en comparación con el subtipo condroblástico. Por último, confirmaron que la deficiente respuesta histológica a quimioterapia se asocia con peor pronóstico (Smeland et al., 2019).

### **Patogénesis**

La etología y los mecanismos patogénicos que subyacen el desarrollo de OS son complejos pero se ha logrado un avance importante en esta área (Y. Zhang et al., 2014).

#### *Factores de Riesgo*

Por la baja incidencia de esta enfermedad, ha sido difícil realizar estudios apropiados para determinar factores de riesgo asociados al desarrollo de OS (Ottaviani & Jaffe, 2009). En 1922 Beck, A et al. reportaron un aumento en el riesgo de desarrollar OS en pacientes que fueron sometidos a radioterapia (Beck, 1922). Esta asociación fue reportada posteriormente por otros autores de forma independiente (Ottaviani & Jaffe, 2009; Vu et al., 1998; Wu et al., 2012). En 1960 Fraumeni et al. describieron una asociación entre el crecimiento y desarrollo fisiológico normal del humano con el riesgo de presentar OS (Fraumeni, 1967). Esta teoría ha sido apoyada en 2 observaciones. La primera ya que el pico de mayor incidencia de OS coincide con las etapas de mayor crecimiento pondoestatural y desarrollo de características sexuales. La segunda en que esta etapa de mayor incidencia de OS se presenta a edades diferentes en ambos sexos (siendo más temprano en el sexo femenino), hallazgo que coincide con la diferencia ampliamente descrita del desarrollo puberal entre el género masculino y femenino. (Gelberg et al., 1997; Mirabello et al., 2011; Ottaviani & Jaffe, 2009).

## **Bases Genéticas**

El genoma de la célula de OS es caótico y complejo (Kansara et al., 2014). La tasa media de mutación ha sido estimada en 1.2 mutaciones por megabase (Franceschini et al., 2020; Gianferante et al., 2017). La cromotripsis (fenómeno mutacional catastrófico presumiblemente único que desencadena un proceso de reparación fortuito de unir fragmentos cromosómicos en un orden y sentido aleatorio, el cual genera grandes reordenamientos genómicos en uno o varios cromosomas) y la kataegis (evento mutagénico en regiones genómicas localizadas en las cuales se presenta de forma aumentada sustituciones C>T y C>G) son mecanismos frecuentemente descritos en las células con OS. La kataegis se encuentra hasta en el 50% de las muestras estudiadas (Gianferante et al., 2017; Kansara et al., 2014). El efecto final de estos mecanismos es desarrollar aneuploidías cromosómicas, incremento en el número de variantes patogénicas, variantes en el número de copias, alteraciones estructurales e inestabilidad genómica (Franceschini et al., 2020; Marozzi et al., 2018).

Estudios de susceptibilidad a cáncer han evaluado y formulado hipótesis acerca de la participación de variantes de un solo nucleótido (SNV) en el desarrollo de osteosarcoma (Kansara et al., 2014). Dentro de los procesos estudiados se encuentran los síndromes de predisposición a cáncer, homeostasis de hueso, vías de crecimiento, reparación de DNA, apoptosis, estrés oxidativo, mecanismos de inmunidad tumoral, entre otros (Gianferante et al., 2017). Algunas de estas SNV se han encontrado en genes causales de algunos síndromes de predisposición a cáncer (SPC). Si bien los casos en los que fueron detectadas no cumplen con criterios diagnósticos del síndrome de predisposición, es posible detectar una presentación familiar heredable de OS (Gianferante et al., 2017)[3].

Los cambios en marcas epigenéticas están fuertemente relacionadas con la tumorigénesis (de Azevedo et al., 2020; Rickel et al., 2017; Sharma et al., 2010). En OS Jones et al. reportaron una hipermetilación global que suprime la expresión microRNAs supresores de tumor (Jones et al., 2012). Por otra parte, Li Y. et al. y Lu J et al. demostraron una sobreexpresión de *IGF2* y *IRX1* (respectivamente) secundario a hipometilación de sus promotores. Li Y et al. proponen que la hipometilación de *IGF2* y el consecuente aumento en la expresión de IGF2-P3 promueve el crecimiento y proliferación durante la malignización de la célula. Por otra parte se ha observado tanto *in vitro* como en modelos murinos que la sobreexpresión de *IRX1* promueve la actividad metastásica de las células de OS. (Y. Li et al., 2009; Lu & Wang, 2015).

### **Mutaciones Conductoras a Cáncer**

La carcinogénesis puede ser inducida por cambios a nivel de un nucleótido, un gen, condensación de cromatina o estímulos celulares (Brown et al., 2019). Las células están en constante riesgo de adquirir mutaciones. A los cambios en la secuencia de DNA que confieren una ventaja selectiva, promueven proliferación y supervivencia, se les denomina mutaciones conductoras de cáncer (Rickel et al., 2017). Las mutaciones conductoras de cáncer se pueden dividir en dos grupos: las que activan un oncogén y las que inhiben a un gen supresor de tumor (Brown et al., 2019; Wu et al., 2012). En función a la frecuencia con la que estos genes se encuentran mutados se dividen en: mutados de frecuencia alta (>20%) denominados como “mountains”, mutados con frecuencia intermedia (2-20%) denominados “hills” y mutados con frecuencia baja (<2%) denominados “tails” (Futreal et al., 2004; Rickel et al., 2017). Es importante mencionar que se comportan de forma independiente con respecto del tipo de tumor estudiado, es decir un gen considerado como “mountain” para un determinado tipo de cáncer

puede o no serlo para otro tipo. (Futreal et al., 2004; Vogelstein et al., 2013). Los esfuerzos en las últimas década se han centrado en identificar las llamadas mutaciones “conductoras a cáncer” tanto en casos esporádicos como en los que sugieren ser asociados a una predisposición heredada (Franceschini et al., 2020; Rickel et al., 2017; Vogelstein et al., 2013). Actualmente, el 2.7% de los genes del genoma humano (595 genes) son reconocidos como conductores a cáncer con una fuerte evidencia de su papel en la tumorigénesis (<http://cancer.sanger.ac.uk/census>) (Ballinger et al., 2016; J. Zhang et al., 2015)

#### *Mutaciones Conductoras a Cáncer en Osteosarcoma*

El OS forma parte de los tumores asociados a algunos SPC. Sin embargo, estos síndromes no son la etiología más frecuente de OS (Gianferante et al., 2017). Dentro de los SPC en los que se describe el desarrollo de OS, las mutaciones conductoras de cáncer se encuentran en genes supresores de tumores. (Rickel et al., 2017). Dentro de los SPC que presentan un riesgo aumentado de desarrollar OS se encuentra el síndrome de Li-Fraumeni causado por variantes patogénicas en el gen *TP53*. La frecuencia de OS se ha reportado hasta en un 11% de los pacientes con síndrome de Li-Fraumeni. Adicionalmente, el retinoblastoma hereditario es causado por variantes patogénicas en el gen *RB1*. En estos pacientes el riesgo relativo aumenta 500 veces con respecto del poblacional. Esto convierte al OS en el tumor secundario más frecuente en pacientes con retinoblastoma. La anemia de Diamond–Blackfan es causada, en la mayoría de los casos, por variantes patogénicas en genes que codifican para proteínas ribosomales. Típicamente presentan aplasia de glóbulos rojos en la infancia y en algunos casos se presentan malformaciones congénitas, además tienen un mayor riesgo de presentar algún

tipo de cáncer. En específico el OS tiene una relación de 32.6:1 con respecto a la población general (Gianferante et al., 2017).

Un grupo importante son los síndromes causados por variantes patogénicas en los genes que codifican para las helicasas de DNA pertenecientes a la familia de RecQ helicasas. (Gianferante et al., 2017). En humanos la familia de RecQ helicasas está compuesta por 5 proteínas denominadas RECQ1, BLM, WRN, RECQ4 y RECQ5. Estas proteínas están dedicadas a preservar la integridad genómica por medio de la preservación de los telómeros, reparación y replicación de DNA. Dentro de los mecanismos de reparación de daño a DNA en los que participan, se encuentran: la recombinación homóloga no alélica, reparación por escisión de base y unión de extremos no homólogos. (Kaiser et al., 2017; Urban et al., 2017). RECQ1 es codificada por el gen *RECQL1*, se ha observado su participación en reinicio de la replicación asociada a la actividad la topoisomerasa 1 previniendo rupturas de doble cadena por superenrollamiento. A esta helicasa no se le ha relacionado un riesgo aumentado de desarrollar OS. La helicasa WRN es codificada por el gen *RECQL2*, variantes patogénicas en este gen causan el Síndrome de Werner. En células con función deficiente del gen se observan mayor frecuencia de translocaciones y deleciones cromosómicas, así como pérdida de longitud telomérica (Urban et al., 2017). Menos del 10% de los pacientes con Síndrome de Werner desarrollan OS (Gianferante et al., 2017). La helicasa BLM es codificada por el gen *RECQL3*, su función es la resolución de estructuras secundarias aberrantes en las horquillas de replicación (Urban et al., 2017). Variantes patogénicas en este gen causan Síndrome de Bloom, 10% de los pacientes con Síndrome de Bloom desarrollan OS (Gianferante et al., 2017). Por último, para el caso de la helicasa RECQL4, codificada por el gen del mismo nombre, hay dos

desordenes alélicos descritos. (Urban et al., 2017). El síndrome de Rothmund-Thomson y RAPADILINO, en estos dos síndromes el riesgo de presentar OS se ha descrito de hasta el 30% en algunas series de casos. La comprensión de las bases moleculares y su desregulación nos han ayudado a comprender la fisiopatología que subyace el desarrollo del OS (Gianferante et al., 2017).

Unas de las vías más relevantes en la biogénesis del cáncer es el reconocimiento y reparación del daño a DNA. Para todos los organismos vivientes mantener la integridad de su material genético es indispensable para la perpetuación de su especie (Franceschini et al., 2020; Gianferante et al., 2017; Rickel et al., 2017). Por otra parte, la mutagénesis es un evento indispensable para la evolución, sin embargo, también juega un rol fundamental en la carcinogénesis y el envejecimiento celular. Es por esto que, las células poseen mecanismos sofisticados, que de forma colectiva reconocen, reducen y reparan el daño al DNA. Existen al menos 5 mecanismos principales de reparación al DNA: reparación por escisión de base, reparación por escisión de nucleótido, reparación de bases mal apareadas, recombinación homóloga y unión de extremos no homólogos. Cada uno de estos procesos se encuentra activo en alguna fase del ciclo celular, además de que reconoce y repara tipos específicos de daño al DNA (Chatterjee & Walker, 2017). En dos estudios de exoma completo en sangre periférica de pacientes con diagnóstico de OS se detectaron variantes patogénicas o probablemente patogénicas en los siguientes genes: *RB1*, *APC*, *MSH2*, *PALB2*, *TP53*, *BRCA1*, *ATM*, *ATR*, y *ERCC2* (Ballinger et al., 2016; Gianferante et al., 2017; J. Zhang et al., 2015). Todos estos genes se encuentran involucrados en el proceso de reconocimiento y reparación de daño al DNA (Franceschini et al., 2020; Gianferante et al., 2017; Rickel et al., 2017).

Los estudios recientes del genoma del OS han mostrado nuevos genes conductores a cáncer que intervienen en diferentes vías relacionadas a su patogénesis. Moriarity et al. realizaron un estudio en modelos de ratones con OS, en ellos se identificaron 65 nuevos genes candidatos conductores a cáncer. Del total de estos, se validaron *Sema4d* y *Sema6d* como nuevos genes conductores a cáncer para OS en humanos. Adicionalmente, se describieron para OS, 33 genes conductores a cáncer previamente descritos en otros tipos de neoplasias (Moriarity et al., 2015; Rickel et al., 2017). La mayoría de estos 33 genes se encuentran involucrados en las vías de señalización ErbB, PI3KAKT-mTOR y MAPK. Dentro de los procesos en los que se propone la participación de estos genes, se encuentran: la iniciación tumoral, progresión tumoral, inestabilidad cromosómica, cromotripsis, invasión y metástasis (Rickel et al., 2017).

Gracias al desarrollo de estudios funcionales conocemos que una célula tumoral posee en su genoma de 2 a 8 mutaciones conductoras a cáncer (Rickel et al., 2017; Vogelstein et al., 2013). No todas las mutaciones conductoras son capaces de inducir tumorigénesis en hueso. A las mutaciones que sí tienen esta capacidad se les conoce como conductoras iniciadoras. Dentro de la lista de genes conductores a cáncer iniciadores, se encuentran: *P53*, *NOTXH1*, *MYC*, *FOS*, *NF2*, *WIFI*, *BRCA2M*, *APC*, *PTXH1* y *PRKAR1A* (McAllister et al., 2006; Merchant et al., 2009; Rickel et al., 2017).

Para OS varios proyectos se encuentran en curso como “The International Cancer Genome Consortium” (ICGC, <http://www.icgc.org/home>) y el proyecto “TARGET OS” (<https://ocg.cancer.gov/programs/target/projects/osteosarcoma>), ambos buscan construir catálogos de genes conductores a cáncer específicamente para osteosarcoma (Rickel et al., 2017).

Actualmente se han reportado con suficiente evidencia un aproximado de 100 genes conductores a cáncer en OS. Dentro de estos se encuentran genes asociados con formas mendelianas de cáncer bien definidas como: *TP53*, *RB1*, *BRCA2*, *BAP1*, *RET*, *MUTYH*, *ATM*, *PTEN*, *WRN* y *RECQL4*. Además, se encuentra un segundo grupo de 4 genes (*ATRX*, *FANCA*, *NUMA1*, y *MDC1*) previamente descritos como genes de susceptibilidad a cáncer. Entre los que se encuentran alterados con mayor frecuencia son: *P53*, *RB1*, *CDKN2A* y *PTEN*. Estos pueden ser considerados como “mountains” (Kovac et al., 2015; Rickel et al., 2017). La desregulación de *MYC* ha sido observada por múltiples autores y su papel en la biogénesis del OS es de especial interés (D. Chen et al., 2018; X. Chen et al., 2014; Han et al., 2012; Joseph et al., 2014; Sayles et al., 2019).

Es importante remarcar que el espectro mutacional de las células con OS se ve influenciado por diversos factores. La diferencia del espectro mutacional más representativa se ha observado entre los subtipos histológicos de OS y en función a la edad de presentación de la enfermedad. Un dato relevante a señalar es que, por el comportamiento epidemiológico de esta enfermedad, la mayoría de la literatura disponible se ha basado en OS con subtipo histológico osteoblástico o condroblástico y de presentación en edad pediátrica (X. Chen et al., 2014; Joseph et al., 2014; Kovac et al., 2015; Perry et al., 2014). Por otra parte los casos de OS secundarios a enfermedad de Paget también se ha demostrado un comportamiento mutacional diferente al resto de los casos de OS (Merchant et al., 2009) (D. Chen et al., 2018; X. Chen et al., 2014; Han et al., 2012; Perry et al., 2014; Sayles et al., 2019).

## **Superfamilia MYC bHLHZ**

La superfamilia bHLHZ se caracteriza por tener un dominio básico de cremallera básica hélice-bucle-hélice ampliamente conservado. Esta superfamilia está integrada por *MYC*, *MAX*, *MGA*, *MXD1*, *MXD3*, *MXD4*, *MXI1*, *MNT*, *MLX*, *MLXIP* y *MLXIPL*. Todos sus integrantes son factores de transcripción y la función de estas proteínas se encuentran fuertemente ligadas a la interacción entre los miembros de la misma. Para su función, estos factores interactúan con otro factor de transcripción dando lugar a un dímero. De esta manera, es posible dar lugar a homodímeros o heterodímeros en función de si la unión se forma con otro miembro de la superfamilia bHLHZ o con otro el mismo factor de transcripción. La activación, función y los blancos de estos dímeros dependen del dímero originado (Figura 2). Los dímeros generados actúan reconociendo secuencias específicas de DNA además de reclutar a otros factores de transcripción, moléculas modificadoras de cromatina y ligasas de ubiquitina.

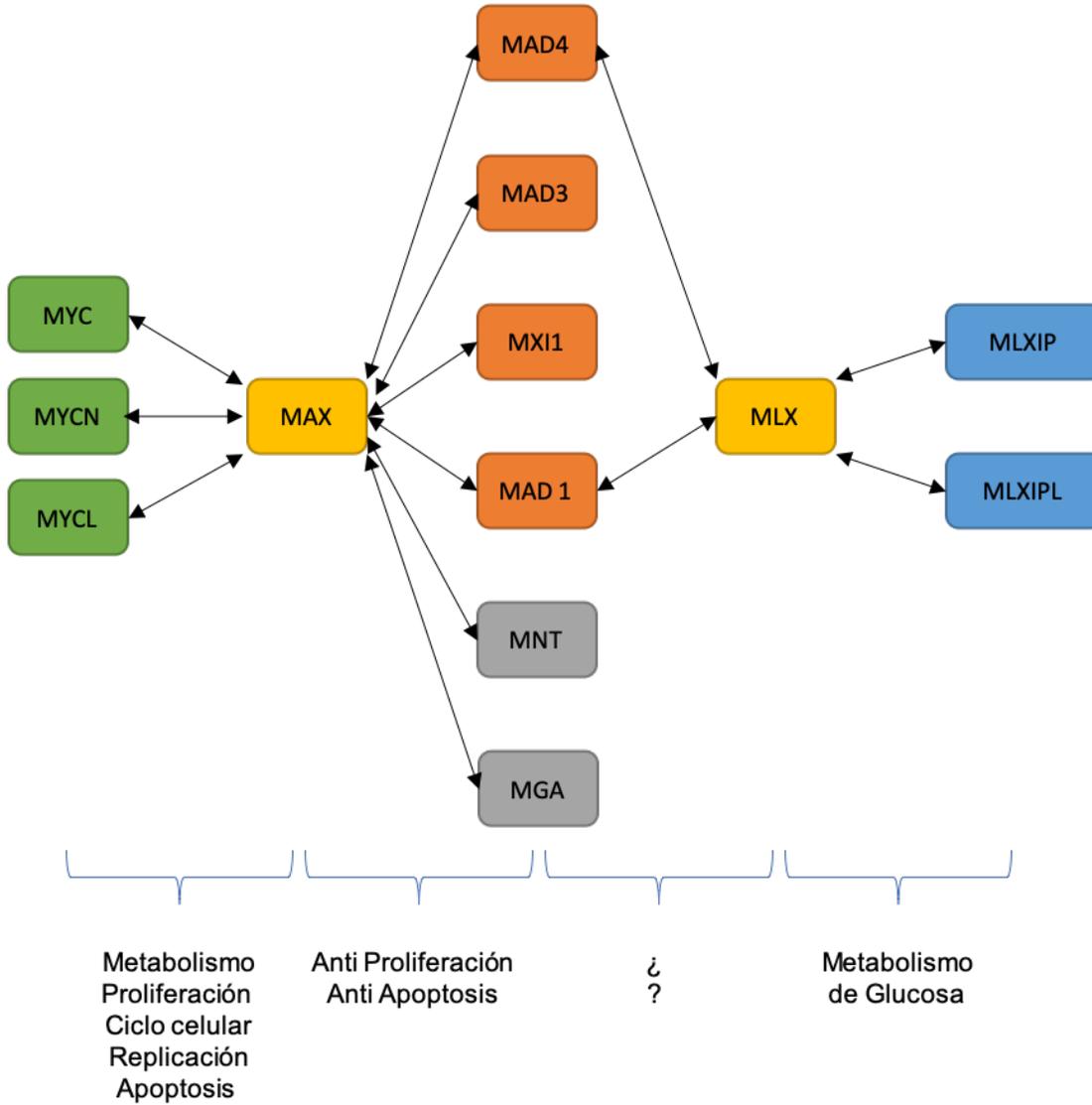


Figura1: Modelo de interacción entre los miembros de la súper familia MYC bHLHZ.

La desregulación de la expresión de los genes/proteínas de la superfamilia MYC bHLHZ ocurre en el 50% de los tumores. Esta desregulación se correlaciona frecuentemente con presentaciones agresivas, resistencia a tratamiento y mal pronóstico (Castell et al., 2018).

En condiciones normales *MYC* es expresado en respuesta a múltiples señales mitogénicas y de desarrollo celular, participa en promover vías de crecimiento, proliferación celular y apoptosis. La proteína *MYC* es un factor de transcripción que responde e integra señales para modificar la expresión génica. (Schaub et al., 2018). *MYC* está compuesto por dos regiones polipeptídicas, residuos transactivadores (N-terminal) y el segmento bHLHZ (C-terminal). El segmento bHLHZ especifica la dimerización mientras que los residuos transactivadores reconocen las secuencias de DNA (Nair & Burley, 2003). Se han identificado que numerosos cambios en el genoma de una célula tumoral tienen como efecto final la desregulación de la función de *MYC*. Estas alteraciones incluyen variantes patogénicas en la secuencia codificante de *MYC* que aumentan la estabilidad de la proteína, variantes patogénicas o amplificaciones de promotores o variantes patogénicas en las vías de transducción de señales que terminan por aumentar la expresión de *MYC*. En OS la desregulación de *MYC* se ha observado del 7% al 78% de los casos. La amplificación de *MYC* es la alteración mas frecuentemente descrita. En concentraciones fisiológicas *MYC* no puede formar homodímeros y carece de la capacidad de reconocer sus secuencias blanco específicas. Es por esto que, *MYC* depende de su heterodimerización con *MAX* para poder reconocer e interaccionar con sus genes blancos. Los heterodímeros *MYC-MAX* reconocen un exanucleótido central (5´CACGTG3´) denominado caja potenciador o Box E por su nombre en ingles. De esta forma *MYC-MAX* activa de forma selectiva la transcripción de genes cuyos promotores contengan secuencia Box E (Nair & Burley, 2003).

*MAX* (factor X asociado a *MYC*) al igual que *MYC* es un factor de transcripción que depende de su dimerización para llevar acabo su función. *MAX* está compuesto por 3 dominios polipetídicos

funcionales, una región básica y las dos regiones restantes que conforman el dominio bHLHZ. Al igual que MYC, el dominio básico tiene como función reconocer el exanucleótido Box E, el dominio bHLHZ media la interacción para formar dímeros (FitzGerald et al., 1999). Para llevar a cabo su función MAX puede formar heterodímeros con los parálogos de MYC (MXI1, MNT y MGA). Se ha observado que la heterodimerización de MAX con los parálogos de MYC tienen un efecto supresor contrario a MYC (FitzGerald et al., 1999; Schaub et al., 2018). A diferencia de MYC, MAX tiene la capacidad de formar homodímeros a concentraciones bajas (FitzGerald et al., 1999; Nair & Burley, 2003). En 1992 Mäkelä et al. describieron una isoforma alternativa de MAX. Esta isoforma es producto de un splicing alternativo, el cual genera un codón de paro prematuro que da lugar a un polipéptido de MAX truncado (delta MAX) (Mäkelä et al., 1992). La isoforma Delta MAX ( $\Delta$ MAX) carece de 9 aminoácidos en el extremo N-terminal que corresponde con el dominio Z además de carecer de la señal de localización nuclear (Hurlin & Huang, 2006). En este mismo estudio Mäkelä et al. analizaron la expresión de MAX y  $\Delta$ MAX en tejidos humanos sanos, encontrando una expresión menor constante de la isoforma  $\Delta$ MAX con respecto de MAX. Además, se encontró una diferencia significativa de la relación MAX/ $\Delta$ MAX según el tipo celular específico. Vincularon este hallazgo con una posible regulación de la expresión ambas isoformas (FitzGerald et al., 1999; Mäkelä et al., 1992). Actualmente se conoce que la ribonucleoproteína nuclear A1 (hnRNPA1) promueve la expresión de la isoforma  $\Delta$ MAX (Babic et al., 2013). Posteriormente Mäkelä et al. en ensayos de interacción de las dos isoformas de MAX con un lisado de c-MYC y entre ambas isoformas, con su posterior inmunoprecipitación, se demostró la formación de los dímeros  $\Delta$ MAX-cMYC,  $\Delta$ MAX-MAX y  $\Delta$ MAX- $\Delta$ MAX. Además demostraron en concentraciones iguales de  $\Delta$ MAX, MAX, MYC y la

presencia de secuencias Box E., la formación de dímeros  $\Delta$ MAX-cMYC es mayor que la formación de dímeros MAX-cMYC a diferencia de cuando está ausente la secuencia Box E (Mäkelä et al., 1992). Babic et al. en 2013 describieron el potencial oncogénico de  $\Delta$ MAX en células inmortalizadas de glioblastoma múltiple (GBM). Este grupo demostró en GBM que, un ratio menor de mRNA MAX/ $\Delta$ MAX, se relaciona con niveles elevados y persistentes de c-MYC, expresión de genes metabólicos y la agresividad de las lesiones (Babic et al., 2013).

Por su papel importante en la tumorigénesis la familia Myc bHLHZ (en especial MYC), ha destacado como un blanco terapéutico en algunos tipos tumorales. El enfoque de inhibir de forma directa a MYC ha sido explorado por algunos grupos de investigadores. Debido a la complejidad de las señales que regulan la expresión y las funciones pleiotrópicas de MYC, además de presencia de vías alternativas para mantener la expresión de MYC y actividad de las genes de la familia bHLHZ (Castell et al., 2018; Castell & Larsson, 2015; Whitfield et al., 2017). Es por esta razón que las proteínas que interactúan con MYC para su función son el nuevo blanco terapéutico de explorar. Por el hecho de que se ha demostrado que MYC necesita de MAX para su funcionamiento y que MAX puede controlar la actividad de MYC, se ha vuelto el blanco terapéutico factible para regular la actividad de MYC (Whitfield et al., 2017). Varios grupos han utilizado un enfoque de pequeñas moléculas para interferir en la interacción MYC-MAX o MYC-MAX-DNA, sin embargo, ninguno de ellos ha logrado demostrar resultados del todo concluyentes (Castell et al., 2018).

## **Planteamiento del problema**

Dentro de las neoplasias malignas de hueso, el OS es la más frecuente. En la población pediátrica es la segunda neoplasia más frecuente. La fisiopatología y biogénesis del OS es poco comprendida. Al ser una enfermedad de baja frecuencia ha sido un desafío describir factores de riesgo y pronósticos. El diagnóstico se basa en manifestaciones clínicas, con evidencia demostrable por métodos de imagen y es confirmado por la toma de biopsia. El tratamiento y la sobrevida no se han modificado de forma significativa en los últimos 20 años. La sobrevida libre de enfermedad a los 5 años, con tratamiento quirúrgico asociado o no a radioterapia, es del 20%. Con un enfoque quirúrgico asociado a quimioterapia, la sobrevida a los 5 años es del 70-80% (en ausencia de metástasis al diagnóstico) y del 20 al 40% si se detectan metástasis al momento del diagnóstico. En los casos en los que se presenta una recaída posterior al tratamiento combinado, la sobrevida a 5 años es del 15%. En las últimas décadas los esfuerzos se han centrado en entender las bases moleculares para el desarrollo del OS. Con base de estos conocimientos, se podrán proponer nuevas estrategias terapéuticas que incidan de forma importante en la sobrevida de los pacientes con OS.

## **Pregunta de investigación**

¿Cuál es el perfil de expresión de MYC/MAX/ $\Delta$ MAX en tejido óseo derivado de OS en comparación con hueso sano?

## **Justificación**

El OS es el tumor maligno primario de hueso más frecuente. Tiene una incidencia mundial de 3.1 casos por millón de habitantes. Representa el 0.2% de los tumores malignos y el 75% de los tumores malignos diagnosticados en adolescentes. Los esfuerzos se han enfocado en el entendimiento de su biogénesis. La descripción de los genes conductores a cáncer en OS es de especial interés. La participación de MYC en la oncogénesis ha sido ampliamente descrita. Hasta el momento se sabe que su función depende de la interacción con otras proteínas y que su potencial oncogénico puede ser inducido y regulado de forma diferencial por la formación de heterodímeros con otras proteínas. De forma inicial se describió el potencial de MAX para promover la oncogénesis por medio del heterodímero MYC/MAX, más, actualmente se sabe que puede actuar de forma independiente. Por lo tanto, la regulación selectiva de la heterodimerización de estas proteínas es un blanco terapéutico que se debe investigar.

## **Hipótesis**

Existe una expresión diferencial de MYC/DMAX en tejido óseo con OS en comparación con el tejido óseo sano.

## Objetivos

### Objetivo General:

- Analizar la expresión de MYC/MAX/DMAX en tejido óseo derivado de OS en comparación con hueso sano

### Objetivos Específicos:

- Analizar la expresión de diferencial de MYC en tejido de pacientes con osteosarcoma comparada con tejido sano adyacente.
- Analizar la expresión de diferencial de las dos isoformas de MAX en tejido de pacientes con OS comparada con tejido sano adyacente.
- Analizar la proporción de las dos isoformas de MAX en tejido de pacientes con OS comparada con tejido sano adyacente.
- Aportar nuevo conocimiento sobre el posible papel de la vía MYC/MAX en el desarrollo y progresión de OS.

## **Metodología**

### **Diseño del estudio:**

Casos y controles pareado.

### **Población de estudio:**

Previa aprobación del comité de ética en investigación del INR LGII Mediante un muestreo a conveniencia, se reclutaron pacientes con diagnóstico de OS tratados en el servicio de Tumores Óseos del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, en un periodo comprendido entre abril 2015 a febrero 2019. Previo a la resección quirúrgica, los pacientes fueron invitados a participar de manera secuencial conforme asistieron a la consulta del servicio de Tumores óseos. Durante el acto quirúrgico se tomaron muestras de tejido tumoral y de tejido sano adyacente.

## **Criterios de selección**

### **Criterios de inclusión**

- Individuos mexicanos que tengan diagnóstico clínico de OS, confirmado histopatológicamente mediante biopsia.
- Individuos mexicanos que tengan diagnóstico clínico de OS, confirmado histopatológicamente mediante biopsia y que fuera posible recolectar muestra de tejido sano adyacente.
- Individuos mexicanos que tengan diagnóstico clínico de OS, confirmado histopatológicamente mediante biopsia y que estén de acuerdo en participar en este estudio.

### **Criterios de Exclusión**

- Individuos mexicanos con OS secundario o asociado a enfermedad de Paget.
- Individuos mexicanos que tengan diagnóstico clínico de OS, confirmado histopatológicamente mediante biopsia en los que no fuera posible recolectar muestra de tejido sano adyacente.
- Individuos mexicanos que tengan diagnóstico clínico de OS, confirmado histopatológicamente mediante biopsia y que no estén de acuerdo en participar en este estudio.

### **Criterios de Eliminación**

- Individuos en los que la muestra de tejido óseo tumoral sea insuficiente o inadecuada para la extracción de RNA.

- Individuos en los que la muestra de tejido sano adyacente sea insuficiente o inadecuada para la extracción de RNA.
- Individuos en los que la muestra de tejido óseo tumoral fuera contaminada en alguno de los diferentes procesos.
- Individuos en los que la muestra de tejido sano adyacente fuera contaminada en alguno de los diferentes procesos.

## Descripción de variables

Tabla 3. Descripción de variables

	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Tipo de Variable</b>	<b>Escala de medición</b>
<b>Variable independiente</b>	Osteosarcoma	Neoplasia maligna primaria de hueso	Cualitativa nominal Dicotómica	Presente/ausente
<b>Variables dependientes</b>	<i>Transcrito derivado del gen MYC</i>	Niveles de expresión relativa de MYC	Cuantitativa Continua	Expresión relativa
	<i>Transcrito derivado del gen MAX</i>	Niveles de expresión relativa de MAX	Cuantitativa Continua	Expresión relativa
	<i>Transcrito derivado del gen dMAX</i>	Niveles de expresión relativa de dMAX	Cuantitativa Continua	Expresión relativa

## **Descripción de procedimientos**

### **Reclutamiento de pacientes**

Se reclutaron pacientes con OS primario, tratados en el servicio de Tumores Óseos en el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, desde febrero de 2015 hasta abril de 2017. Se les invitó a participar en la investigación. Se firmó el consentimiento informado y posteriormente, durante el acto quirúrgico, se obtuvieron muestras de tejido tumoral y tejido adyacente sano. Se continuó con los individuos que cumplían con los criterios de selección previamente mencionados.

### **Recolección de muestras del tejido**

1. Se acudió a quirófano en la fecha programada para la resección quirúrgica de la lesión primaria de OS.
2. Se recolectó muestra de tejido óseo proveniente de la lesión primaria de OS.
3. Se recolectó muestra de tejido óseo sano proveniente de la región adyacente a la lesión primaria de OS. Se verificó por estudio histopatológico la presencia de cambios sugestivos de actividad tumoral.
4. Se colocaron las muestras en microtubos estériles previamente rotulados.
5. La cantidad de tejido fue variable en función de la disponibilidad del mismo.
6. Se almacenó a temperatura de -80 °C (grados centígrados) hasta el procesamiento de las muestras.

## **Extracción de RNA**

Las muestras de RNA se purificaron a partir de 30 microgramos de tejido óseo, por la técnica de TRIzol. Se realizó mediante el kit de QUIAGEN según las especificaciones del fabricante. Posteriormente se cuantificó el RNA con un NanoDrop (Thermo Scientific). El rendimiento fue de 20-50 ng/ $\mu$ L.

1. Tomar 30 miligramos (mg) de muestra y realizar cortes finos de ella.
2. Homogeneizar con 1 mililitro (ml) de TRIzol los 30 miligramos de tejido.
3. Llevar a Vortex durante 2 minutos (min).
4. Incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
5. Homogenizar con vortex durante 2 minutos.
6. Agregar 0.2 ml de cloroformo (por cada 1 ml de TRIzol usado).
7. Homogenizar con vortex durante 30 segundos (s).
8. Incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
9. Centrifugar las muestras a 13,000 RPM durante 15 min a 4 °C.
10. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.
11. Adicionar 0.6 ml de isopropanol (misma cantidad de la fase acuosa).
12. Incubar a -20 °C durante una hora y media.
13. Centrifugar a 13,000 RPM durante 10 min a 4 °C.
14. Decantar.
15. Adicionar 1 ml de etanol al 75%.

16. Centrifugar a 13,000 rpm durante 7 min a 4 °C.
17. Decantar.
18. Adicionar 1 ml de etanol al 75%.
19. Centrifugar a 13,000 rpm durante 7 min a 4 °C.
20. Decantar.
21. Dejar secar el pellet a temperatura ambiente durante 10 min aproximadamente.
22. Resuspender el pellet con agua.
23. Cuantificar en espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher, Inc.).
24. Almacenar a -80 °C de temperatura.

### **Síntesis de cDNA**

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1 µg de RNA total. Se realizó mediante el kit de Thermo Scientific (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) según las especificaciones del fabricante.

1. Agregar los siguientes reactivos en un tubo estéril sin nucleasa en hielo en el orden indicado:

Templado de RNA	RNA total	0.1 ng - 5 µg
Primer	Random Hexamer primer	1 µL
Agua libre de nucleasas		to 12 µL
Volumen total		to 12 µL

2. Incubación a 65 °C durante 5 min.

3. Incubación de los siguientes reactivos en el orden indicado.

5X Reaction Buffer	4 $\mu$ L
RiboLock inhibidor de RNase (20 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
10 mM dNTP Mix	2 $\mu$ L
RevertAid M-MuLV RT (200 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Volumen total	20 $\mu$ L

4. Mezclar suavemente y centrifugar brevemente.

5. Incubación durante 5 min a 25 °C.

6. Incubación durante 60 min a 42 °C.

7. Terminar la reacción calentando a 70 ° C durante 5 minutos.

8. Almacenar a -80 °C de temperatura.

## qPCR

### Perfiles de expresión *MYC*, *MAX*, *dMAX* y *GAPDH*

Posterior a la síntesis de cDNA total, se utilizó la técnica de PCR tiempo real (qPCR) por medio de SYBR Green. Los genes de interés analizados fueron *MYC*, *MAX* y  $\Delta$ *MAX*. El gen de referencia analizado fue *GAPDH*.

### Diseño y optimización de qPCR oligonucleótidos

Se utilizó el programa *Primer 3* para el diseño de oligonucleótidos para los genes *MYC*, *MAX*,  $\Delta$ *MAX* y *GAPDH*. *MYC*, *MAX* y  $\Delta$ *MAX* son los genes blanco de interés. *GAPDH* fue usado como gen de referencia y su expresión fue utilizada para permitir la medición relativa de expresión de los genes de interés. La secuencia de los oligonucleótidos usados se especifican en la tabla X, tienen un contenido de GC entre 45 y 55 la  $T_m$  usada fue de 60°C y en los ensayos *in silico* ninguno mostró la formación de dímeros. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Sigma-Aldrich.

Tabla 4. Descripción de los oligonucleótidos

Primer	Primer sequence 5'-3'	Tm °C	Longitud (pb)
ΔMAX-F	AGGGGAAAGCGAGAGCTG	60	136
ΔMAX-R	ACGGACCAGGTGGTAACTTG	60	
WT-MAX-F	GCTCTTCTGGAGCAGCAAGT	60	101
WT-MAX-R	GCGTTGGTGTAGAGGCTGTT	60	
MYC-F	TTCGGGTAGTGGAAAACCAG	60	92
MYC-R	CACCGAGTCGTAGTCGAGGT	60	
GAPDH-F	AAGGGTTAACGGTCCTGGTT	60	101
GAPDH-R	TTTCACAATGACCACCCAGA	60	

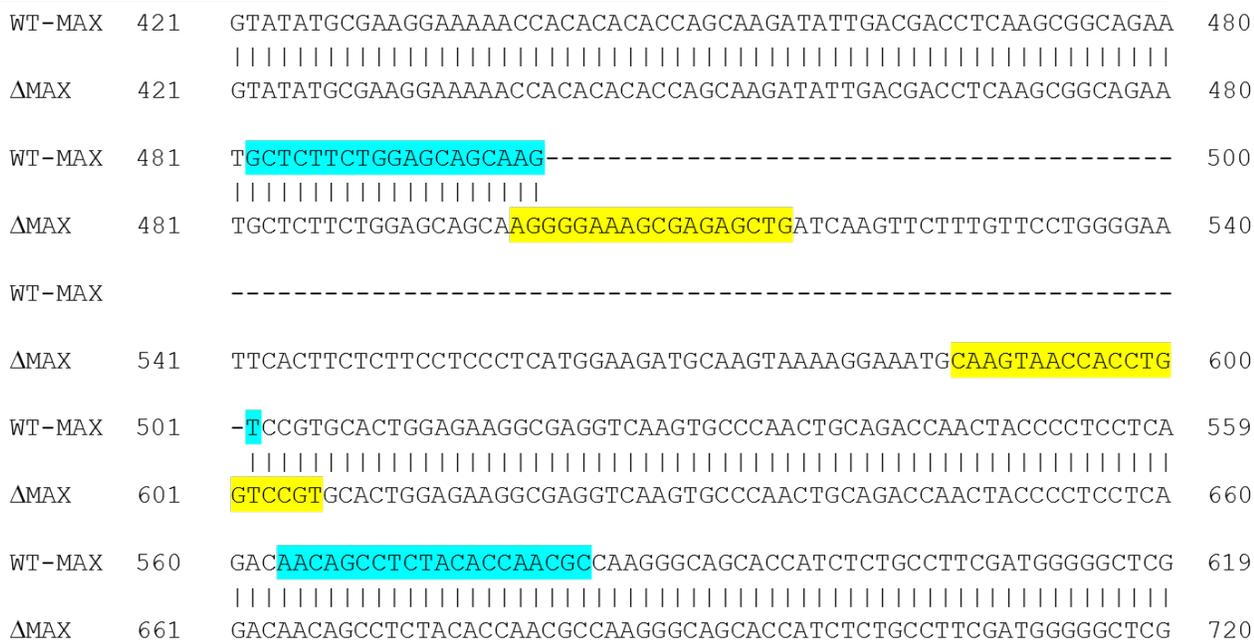


Figura 2: Representación de la secuencia de mRNA de *MAX* y  $\Delta$ *MAX* usadas para el diseño de oligonucleótidos. Señalando en azul las secuencias usadas para el diseño de los oligonucleótidos de *MAX*. Señalando en amarillo las secuencias usadas para el diseño de los oligonucleótidos de  $\Delta$ *MAX*.

## **Estandarización**

En la primera etapa del estudio se realizó la estandarización de la técnica de PCR tiempo real (qPCR), los experimentos se llevaron a cabo en el equipo StepOne Plus (Applied Biosystems). En estas reacciones se utilizaron muestras de cADN de muestras de hueso sano, provenientes del banco del INR. La expresión relativa se estimó mediante el cálculo de las veces cambio de expresión. Para conocer la eficiencia de la reacción de qPCR, se realizó una curva estándar y posteriormente curvas de disociación para distinguir la amplificación de los genes de interés y del gen de referencia, de esta forma descartar la amplificación de productos inespecíficos .

## **Normalización**

La normalización de los experimentos se dio por la cantidad total de cDNA añadida y por el análisis simultáneo de un gen normalizador, en este caso se utilizó a *GAPDH* como gen normalizador. Se realizó la determinación por triplicado de cada muestra para asegurar la eficiencia constante de amplificación como se explica más adelante.

## **Determinación de la eficiencia de la reacción**

Generación de curvas estándar

Se realizó la construcción de curvas estándar por factor de dilución 1:10 en serie, a partir de una concentración inicial de cDNA de hueso sano, esto se realizó para cada par de oligonucleótidos. Para la detección de los amplicones se utilizó SYBR Green (fluoróforo que se asocia e interactúa con moléculas de DNA de doble cadena y el cual emite fluorescencia bajo luz ultra violeta). La fluorescencia emitida es cuantificada al final de cada reacción y se estima la cantidad de cDNA amplificada. Los parámetros de la qPCR se describen a continuación, temperatura de desnaturalización 95 °C y la temperatura de elongación 60 °C. Los ciclos se

programaron de la siguiente forma: elevar de forma inicial la temperatura a 95 °C durante 10 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos seguido por disminuir la temperatura a 60 °C durante 1 minuto (figura 3). Las concentraciones de los reactivos utilizados se especifican en la tabla 5.

Tabla 5. Especificación de reactivos usados para qPCR

Reactivo	Volumen/muestra (µL)	Volumen/96 muestras (µL)
Maxima SYBR Green.qPCR Master mix 2X	5.0	480
ROX	0.02	0.192
H <sub>2</sub> O	3.38	324.48
Oligonucleótido 10x F	0.3	28.8
Oligonucleótido 10x R	0.3	28.2
cDNA	1	96
<b>Volumen total</b>	10	960

Para la qPCR se utilizó el valor de Ct (Cycle Threshold), la cual representa el numero de ciclos necesarios para alcanzar un umbral de fluorescencia. La correlación del Ct y la cantidad de cDNA añadido de manera inicial se ven relacionados ya que a mayor cantidad de cDNA presente en la reacción inicial el se requerirá de un menor numero de ciclos para alcanzar el Ct.

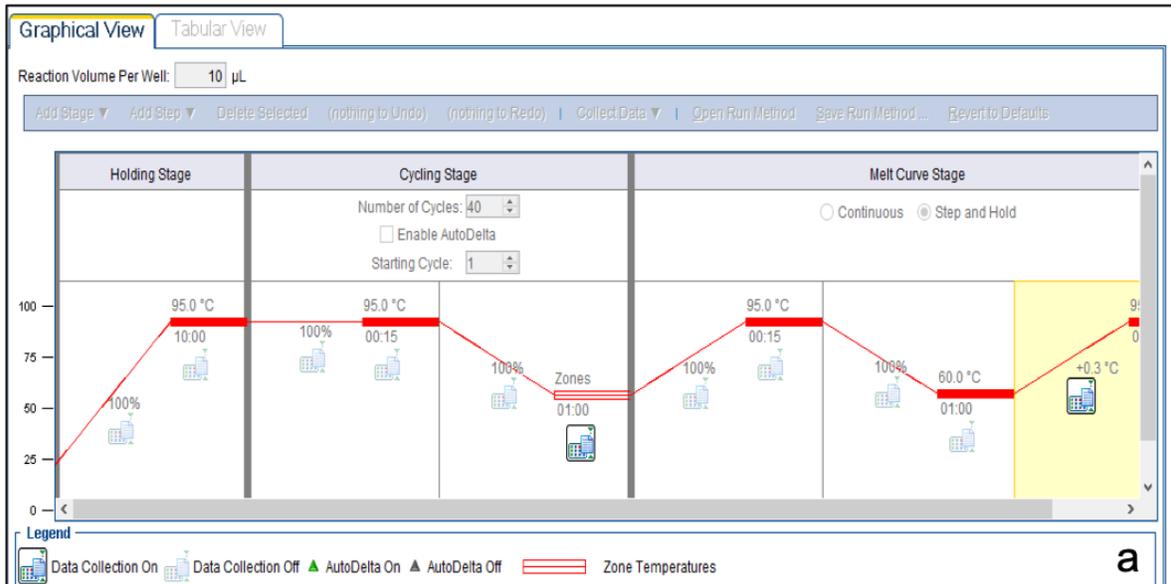


Figura 3: a) Especificaciones de las condiciones de reacción utilizadas para las reacciones SYBR Green I en StepOne Plus (Applied Biosystems).

### Condiciones de reacción

Se analizó la expresión relativa de *MYC*, *MAX*,  $\Delta$ *MAX* y *GAPDH* en el *cDNA* extraído de las muestras de tejido óseo tumoral y tejido óseo sano. Las reacciones se realizaron por triplicado para cada muestra, de esta forma obtuvo un Ct promedio. Además, se analizaron por segunda ocasión de forma aleatoria algunas muestras. En todas las placas se analizó la expresión relativa de *MYC*, *MAX*,  $\Delta$ *MAX* y *GAPDH* en el *cDNA* proveniente de una muestra de hueso sano (calibrador) y controles negativos para controlar la variabilidad interplaca. Se usaron las condiciones y concentraciones de reactivos previamente especificados en la tabla 5. *GAPDH* fue utilizado como gen de referencia y normalizador.

## Curva de disociación

Las curvas de disociación se analizan con la finalidad de distinguir la amplificación de los genes de interés y el gen de control y al mismo tiempo descartar la amplificación de productos inespecíficos. Esta curva se construye con los datos de la temperatura necesaria para la disociación de las moléculas de DNA de doble cadena. Se basa en que una la temperatura requerida, esta dada principalmente por la longitud de los fragmentos de DNA amplificados.

## Quantificación relativa

Para determinar el nivel de expresión se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  se midieron las diferencias ( $\Delta$ ) entre el ciclo umbral (Ct). En esta determinación de la relación de expresión relativa de los genes de interés se midieron las diferencias de recambio ( $\Delta$ ) entre el ciclo umbral (Ct). El cálculo se llevó con la siguiente formula:

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

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

## **Análisis estadístico**

Se realizó una descripción de las características demográficas de la población estudiada. Se realizó una descripción de las principales características clínicas y histopatológicas de la población estudiada.

Se realizó un análisis estadístico utilizando los valores de las veces de cambio de los 2 grupos para cada gen de interés con el programa "GraphPad Prism 8". Se calculó la mediana de las veces de recambio de ambos grupos para cada uno de los genes de referencia. Por el número de casos se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Se aplicó la prueba de Wilcoxon entre los valores de las veces de cambio de para cada muestra de tejido óseo tumoral y su control pareado, para cada uno de los genes de interés.

## Resultados

### Datos clínicos

Se recolectaron 19 muestras de tejido óseo tumoral de pacientes con diagnóstico de OS, como tejido control se recolectó tejido sano adyacente del mismo paciente. 10 de los pacientes fueron del género masculino y 9 del género femenino, con una relación hombre-mujer 1.11:1. Con respecto al origen demográfico de los pacientes, 5 pacientes fueron originarios de Ciudad de México, 5 fueron originarios del Estado de México, 3 eran originarios de Puebla y se reclutó un paciente proveniente de cada uno de los siguientes estados: Baja California Sur, Guerrero, Quintana Roo, Sinaloa, Tabasco y Veracruz. El rango de edad del inicio de los síntomas fue de 10 a 32 años, con una edad media de 18.7 años. El rango de edad al momento de la toma de la biopsia fue de 10 a 36 años, con una edad media de 19.6 años. El dolor y aumento del volumen en la región afectada fueron referidas por el 94.7% (18) de los pacientes. La limitación de movilidad de la articulación afectada se observó en el 79% (15) de los casos. El antecedente de trauma se encontró en el 21% (4) de los casos. Por último, en dos casos, el diagnóstico se asoció a la presencia de una fractura patológica en la región afectada. Con respecto a la localización de la tumoración primaria, el 100% (19) de los casos se encontraba confinada a extremidades inferiores. En el 94.7% (18) la neoplasia se encontraba confinada a sólo una estructura ósea y en un caso se encontró que involucraba a dos estructuras óseas. Con respecto a la lateralidad el 63% (12) de los casos se encontraron en la extremidad inferior derecha y el restante 37% (6) de los casos en la extremidad inferior izquierda. De los huesos de las extremidades inferiores, el fémur en su porción distal representó el 74% (14), la tibia en su porción proximal representó el 15.7% (3), en un caso la tumoración afectaba tanto la porción

distal del fémur y la proximal de la tibia y por último sólo en un caso la neoplasia se localizó en la porción proximal del peroné. Con respecto a los cambios histopatológicos observados en las biopsias tumorales en 63% (12) de los casos la naturaleza de la matriz extracelular evidenció predominio de un sólo subtipo celular. De estos 12 casos, los subtipos osteoblástico y telangiectásico se observaron en 3 casos cada uno, el subtipo condroblástico se observó en 2 casos y los subtipos células pequeñas, fibroblástico, indiferenciado y paraosteal se reportaron en un caso cada uno. En los 7 casos restantes la naturaleza de la matriz extracelular mostró predominio de al menos 2 subtipos celulares diferentes. Dentro de estos casos los subtipos condroblástico y osteoblástico se reportaron en 6 de los casos, y los subtipos fibroblástico y telangiectásico se reportaron en 3 y 2 casos respectivamente. Con respecto a la presencia de metástasis, éstas fueron detectadas en el 73.6% (14) de los casos y todas ellas se encontraban localizadas en pulmón.

Tabla 6. Resumen de características e histopatológicas de los pacientes.

Variable	Osteosarcoma (n=19)	
	No.	%
<b>Edad de presentación</b>		
<18	12	63
>18	7	37
<b>Sexo</b>		
Hombres	10	53
Mujeres	9	47
<b>Localización</b>		
Fémur distal	14	75
Tibia proximal	3	15
Fémur distal y tibia proximal	1	5
Peroné proximal	1	5
<b>Subtipo Histológico</b>		
Osteoblástico	3	15.7
Telangiectásico	3	15.7
Condrolástico	2	10.5
Células pequeñas	1	5
Fibroblástico	1	5
Indiferenciado	1	5
Paraosteal	1	5
Complejos	8	38.1
<b>Metástasis</b>		
Si	14	73.6
No	5	26.4

### Curvas de disociación

Se obtuvo una curva de disociación para cada uno de los genes de interés y el gen de referencia (figuras 4-7). En estas curvas no se observó la amplificación de productos inespecíficos en ninguno de los casos.

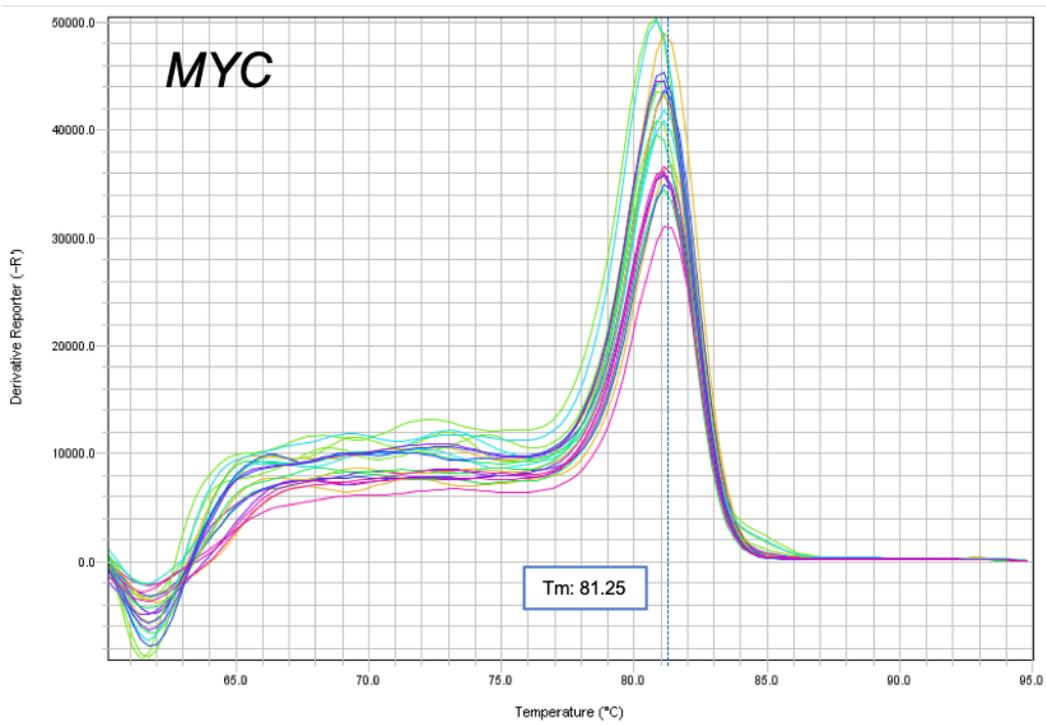


Figura 4. Curva de disociación del de interés *MYC*. Se observa la temperatura de la reacción en la que se desnaturaliza esta secuencia de cDNA.

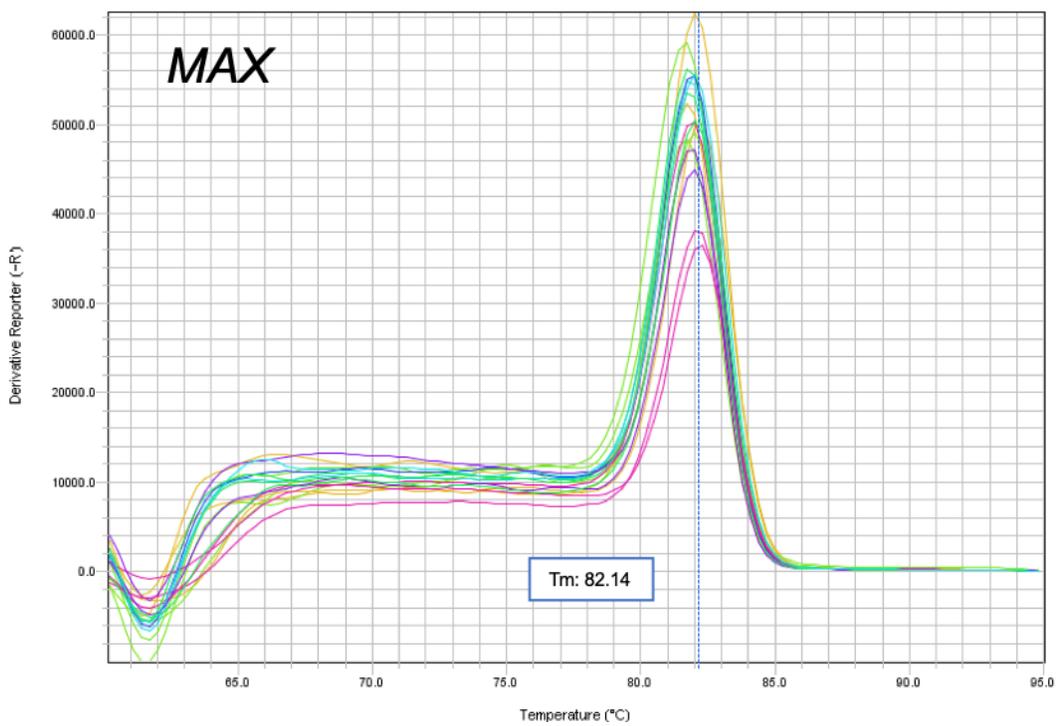


Figura 5. Curva de disociación del de interés *MAX*. Se observa la temperatura de la reacción en la que se desnaturaliza esta secuencia de cDNA.

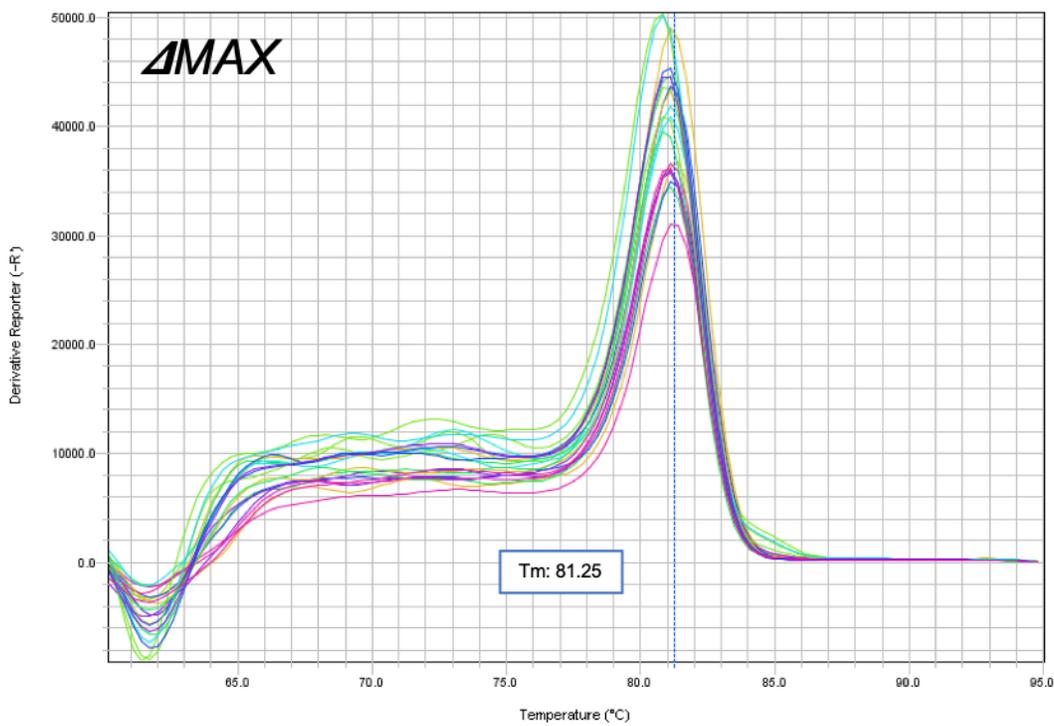


Figura 6. Curva de disociación del de interés  $\Delta$ MAX. Se observa la temperatura de la reacción en la que se desnaturaliza esta secuencia de cDNA.

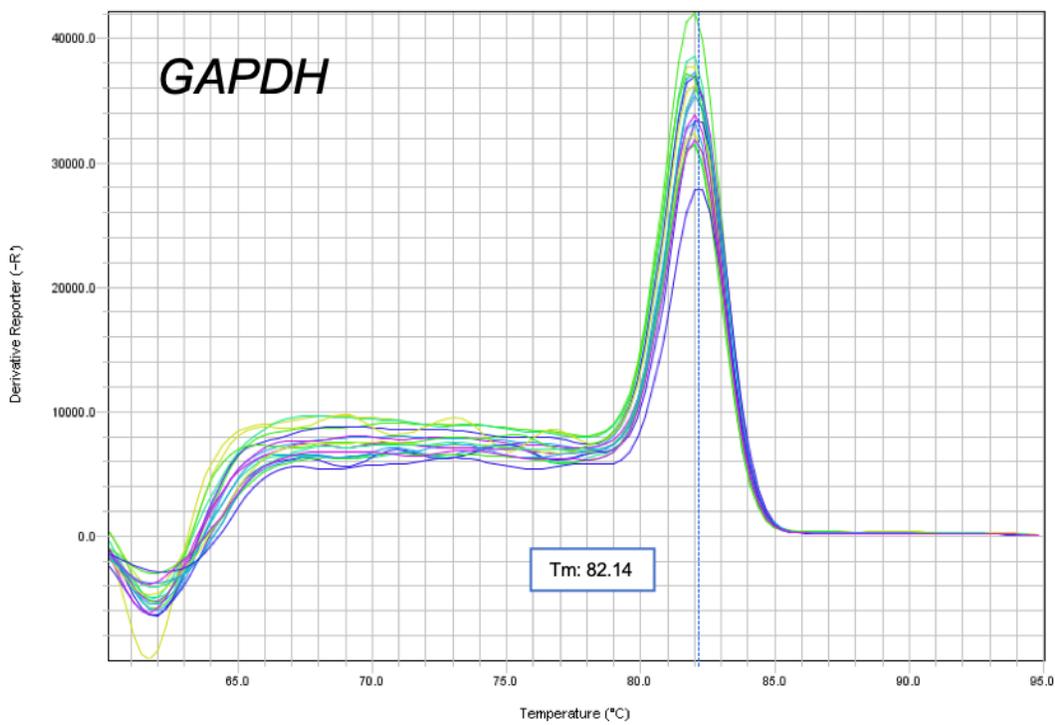


Figura 7. Curva de disociación del de interés *GAPDH*. Se observa la temperatura de la reacción en la que se desnaturaliza esta secuencia de cDNA.

### **Curvas de estandarización**

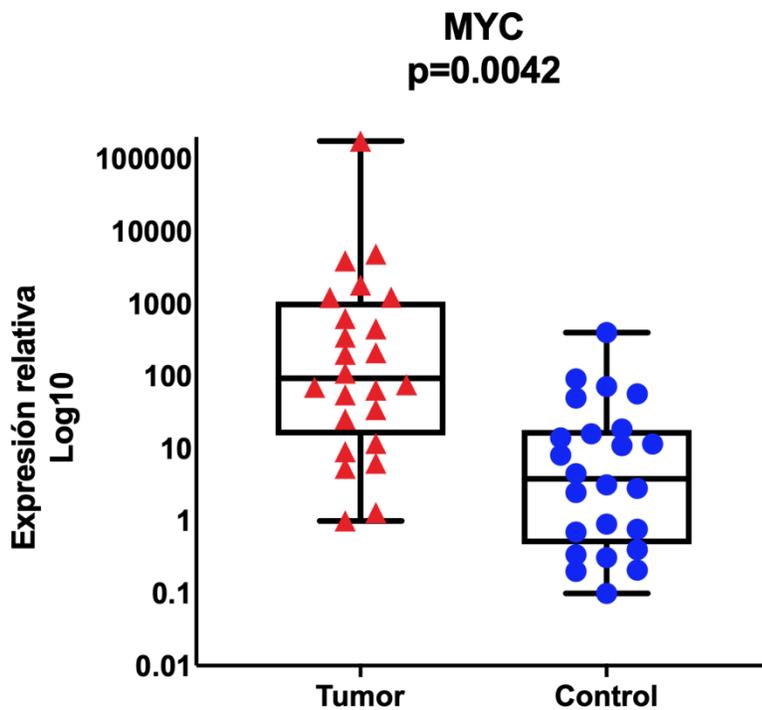
Se realizaron las curvas estándar en las condiciones previamente mencionadas, demostrando, que el diseño de los experimentos es adecuado para todos los genes blancos. La eficiencia obtenida de las curvas estándar para *MYC*, *MAX*,  $\Delta$ *MAX* y *GAPDH* fue de 105.765, 109.858, 109.028 y 104.934 respectivamente. En la figura 8 se muestran las graficas de las curvas estándar para cada uno de los genes.



Figura 8: a) Especificaciones de las condiciones de reacción utilizadas para las reacciones SYBR Green I en StepOne Plus (Applied Biosystems). b) Curva de estandarización MAX-103. c) Curva de estandarización MAX-160. d) Curva de estandarización MYC. e) Curva de estandarización GAPDH.

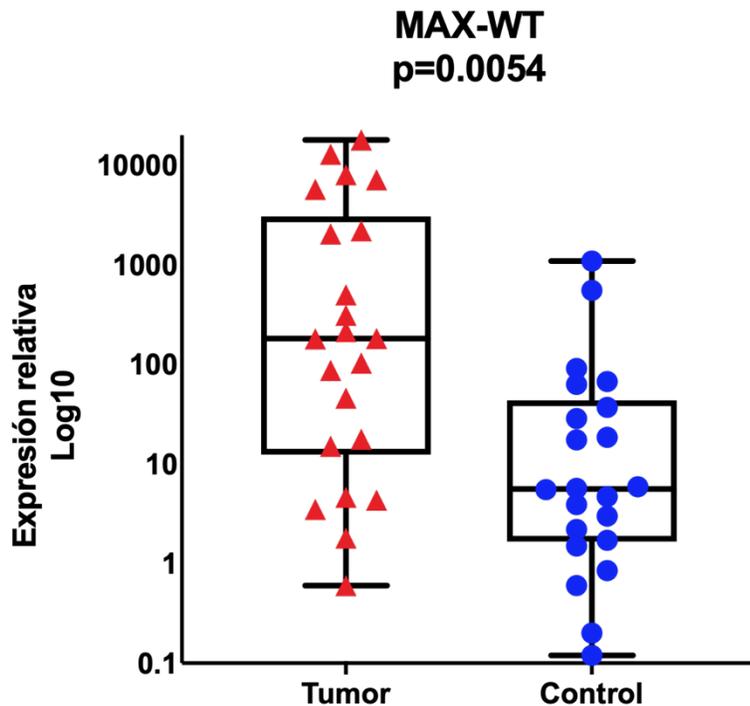
## Cuantificación relativa

Para la Cuantificación relativa de *MYC* se analizaron por la técnica descrita 24 muestras provenientes de tejido óseo con OS y sus respectivos controles pareados. La mediana de expresión relativa de *MYC* en las muestras de tejido óseo tumoral fue mayor que la mediana de expresión relativa de *MYC* en las muestras de tejido óseo sano. Se aplicó prueba de Wilcoxon a las veces de cambio calculadas a partir de la expresión relativa de *MYC* para cada una de las muestras de tejido con OS y sus controles sanos pareados, de la cual se obtuvo una  $p=0.0005$ , estadísticamente significativa. (Grafica 1).



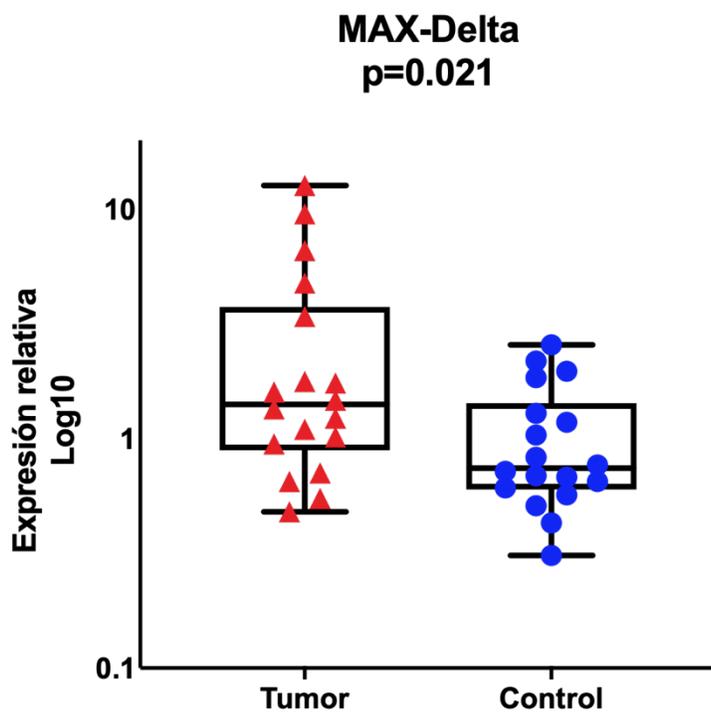
Grafica 1. Cuantificación de Expresión Relativa de *MYC*

Para la Cuantificación relativa de *MAX* se analizaron por la técnica descrita 22 muestras provenientes de tejido óseo con OS y sus respectivos controles pareados. La mediana de expresión relativa de *MAX* en las muestras de tejido óseo tumoral fue mayor a la mediana de expresión relativa de *MAX* en las muestras de tejido óseo sano. Se aplicó prueba de Wilcoxon a las veces de cambio calculadas a partir de la expresión relativa de *MAX* para cada una de las muestras de tejido con OS y sus controles pareados sanos, de la cual se obtuvo una  $p= 0.0054$ , estadísticamente significativa. (Grafica 2).



Grafica 2. Cuantificación de Expresión Relativa de *MAX*

Para la Cuantificación relativa de  $\Delta MAX$  se analizaron por la técnica descrita 19 muestras provenientes de tejido óseo con OS y sus respectivos controles pareados. La mediana de expresión relativa de  $\Delta MAX$  en las muestras de tejido óseo tumoral fue mayor a la mediana de expresión relativa de  $\Delta MAX$  en las muestras de tejido óseo sano. Se aplicó prueba de Wilcoxon a las veces de cambio calculadas a partir de la expresión relativa de  $\Delta MAX$  para cada una de las muestras de tejido con OS y sus controles pareados sanos, de la cual se obtuvo una  $p=0.021$ , estadísticamente significativa (Grafica 3).



Grafica 3. Cuantificación de Expresión Relativa de  $\Delta MAX$

## Discusión

El OS es la neoplasia primaria maligna de hueso más frecuente. En la actualidad, a pesar de los esfuerzos realizados, su tratamiento continúa siendo el mismo que hace más 20 años y por lo tanto la sobrevivida se ha mantenido sin modificaciones. De las principales razones por las que se ha dificultado el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos es el poco conocimiento de la fisiopatología y de las bases moleculares subyacentes al desarrollo de OS. La identificación de genes conductores a cáncer en OS ha tomado relevancia no sólo para entender a esta patología si no para desarrollar nuevos fármacos que tengan como blancos la modulación de expresión de estos genes. La desregulación en la expresión de los genes pertenecientes a la súper familia MYC bHLHZ ocurre hasta en el 50% de los tumores. La expresión diferencial de los diferentes miembros de esta súper familia y la consiguiente formación de homo o heterodímeros que se ha observado se puede correlacionar con diferentes presentaciones clínicas, respuesta a tratamiento y con el pronóstico de los pacientes. Es por esto que, el estudio de la expresión de *MYC*, *MAX* y  $\Delta$ *MAX*, en tejido óseo con OS, es una vía de interés.

En este estudio se describen las características clínicas y los perfiles de expresión relativa de *MYC*, *MAX* y  $\Delta$ *MAX* en hueso sano y en hueso con OS proveniente de 19 mexicanos con diagnóstico de OS. Con respecto al género observamos un ligera predilección por el género masculino con un radio 1.11:1 con respecto al género femenino con lo que coincidimos la literatura (Baena-Ocampo et al., 2009; Gianferante et al., 2017; Ottaviani & Jaffe, 2009; Rodríguez-Franco et al., 2016). La edad media de diagnóstico observada fue de 18.7 años, ligeramente mayor a la descrita por grupos series de otros países, este dato se puede ver influenciado por el tiempo que transcurre entre acudir a recibir atención médica y ser referidos

de un primer nivel a un segundo o tercer nivel de atención médica y por lo tanto en integrar el diagnóstico de OS. En nuestro sistema de salud la mayor proporción de los casos son atendidos en un segundo nivel de atención médica y solo aquellos casos complejos o de difícil manejo son atendido en un tercer nivel de atención médica, como lo es el Instituto Nacional de Rehabilitación. Por lo que, el tiempo en integrar el diagnóstico es mayor en nuestro entorno comparado con el de otros países y el acceso a la atención en centros especializados no esta disponible para todos los pacientes (Ottaviani & Jaffe, 2009; Rickel et al., 2017). Con respecto a la sintomatología referida por los pacientes coincidimos con lo previamente descrito siendo el dolor, el aumento de volumen y la limitación de movilidad, la sintomatología más frecuente. El antecedente de trauma o la presencia de una fractura patológica fueron los menos frecuentemente descritos (Durfee et al., 2016; Geller & Gorlick, 2010; Gianferante et al., 2017; Moore & Luu, 2014). Con respecto a la localización de la lesión primaria de OS, encontramos que la más frecuentemente afectada es en huesos largos de las extremidades inferiores en especial, en las porciones que forman parte de la articulación de la rodilla, con lo que confirmamos lo previamente reportado por las otras series mexicanas y extranjeras (Baena-Ocampo et al., 2009; Moore & Luu, 2014; Ottaviani & Jaffe, 2009; Rickel et al., 2017; Rodríguez-Franco et al., 2016). La detección de metástasis al momento del diagnóstico se dio en el 73.6% de los casos, mucho mayor que el 10-20% reportado por la literatura (Durfee et al., 2016; Geller & Gorlick, 2010; Gianferante et al., 2017; Y. Zhang et al., 2014). Este dato se puede deber a que el 74% de los casos se estadificaron en el estadio III de la escala Enneking y en el resto de las series el estadio más frecuente al diagnóstico fue el IIB de la escala de Enneking (Cates, 2018; Steffner & Jang, 2018). Con respecto a la variedad histológica reportada, el subtipo

osteoblástico fue el más frecuente, observado en 3 pacientes en más del 50% de su matriz y en 6 casos asociado a más subtipos histológicos, con lo que apoyamos la observación de que el componente histológico más frecuente es el osteoblástico (Cates, 2018; Steffner & Jang, 2018). En el análisis de la expresión de *MYC*, como era de esperarse, se encontró en el 100% (de las muestras analizadas) una mayor expresión de *MYC* en las muestras de OS con respecto a sus controles, con una  $p=0.0005$ . La desregulación de la expresión de *MYC* en OS previamente reportada es del 7-78% de los casos, en nuestra serie se observó en el 100%, éste aumento puede ser por la progresión de la enfermedad al momento de toma de la biopsia y la consiguiente adquisición de la desregulación de *MYC* (Nair & Burley, 2003; Rickel et al., 2017; Schaub et al., 2018). Se conoce la incapacidad de *MYC* para generar homodímeros en condiciones normales y que es posible la generación de homodímeros cuando se encuentra a mayores concentraciones. En las muestras de osteosarcoma con respecto de los controles la expresión de *MYC* se encontró significativamente elevada, estas condiciones podrían propiciar la formación de homodímeros y de esta manera desregular la actividad de *MYC*.

Con respecto al análisis de la expresión relativa de *MAX*, al igual que lo encontrado con *MYC*, se encontró una mayor expresión relativa en las muestras con OS con respecto a sus controles con una  $p$  de 0.0054 (estadísticamente significativa). Por otra parte, como se pensó en un inicio, los niveles de expresión relativa de  $\Delta$ *MAX* en las muestras de OS con respecto a sus controles, se encontró una ligera diferencia con una  $p$  de 0.021 con significancia estadística.

La función de los dímeros formados por las interacciones de *MYC*, *MAX* y  $\Delta$ *MAX* es compleja y se ve influenciada por la abundancia y localización de estas proteínas. La capacidad de *MAX* de actuar de forma independiente a *MYC* ha sido previamente descrita, la sobreexpresión de

MAX puede tener como efecto final la desregulación de sus blancos habituales y la regulación de nuevos genes, ya sea por la formación de homodímeros o heterodímeros con MYC o  $\Delta$ MAX (FitzGerald et al., 1999; Schaub et al., 2018). Con respecto a  $\Delta$ MAX se demostró por FitzGerald et al, que esta isoforma de MAX tiene mayor afinidad para formar heterodímeros con MYC y MAX incluso cuando se encuentran a la misma concentración. Los heterodímeros asociados a  $\Delta$ MAX tiene a estar relacionados con la expresión de genes que promueven la proliferación, crecimiento y supervivencia celular (Mäkelä et al., 1992). Si bien los niveles de  $\Delta$ MAX no mostraron el aumento esperado, el aumento en la expresión de MYC y MAX podría propiciar mayor formación de heterodímeros  $\Delta$ MAX/MAX y  $\Delta$ MAX/MYC. De esta forma sin depender de forma directa del aumento en expresión de  $\Delta$ MAX, modificar la expresión de sus genes blancos o adquirir nuevos genes blancos (Babic et al., 2013).

En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación en que analizaron 15 muestras pareadas de tejidos tumorales y hueso sano adyacente provenientes de pacientes con diagnóstico de OS, se analizó el perfil de expresión de microRNAs y su relación con la evolución clínica. Dentro de los microRNAs que se encontraron con una expresión diferencial (entre el tejido tumoral y sano) destacaron hsa-miR-486-3p, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-34a-5p y hsa-miR-1228-3p, por su participación en vías de carcinogénesis conocidas (Monterde-Cruz et al., 2020). Dentro de ellos, hsa-miR-335-5p es considerado un miRNA supresor de tumor previamente asociado a cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de vesícula biliar y cáncer de próstata (Xie et al., 2019). La sobre expresión de hsa-miR-335-5p en células con OS inhibe la proliferación, migración e invasión celular, estos mediante la regulación de sus genes blanco como *SNIP1*, *BIRC5*, *TUG1* y *ROCK1* (Monterde-Cruz et al., 2020; Xie et al., 2019). Con los mapas de enriquecimiento y

de interacción de hsa-miR-335-5p Cruz et al proponen que este miRNA, puede regular por medio de la interacción de la secuencia semilla de hsa-miR-335-5p con el 3ÚTR de ambas isoformas de MAX (Tabla 7), por consiguiente modificar la actividad de MAX y  $\Delta$ MAX. (Monterde-Cruz et al., 2020).

Tabla 7. MAX como blanco de hsa-miR-335-5p

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	PCT
Position 151-157 of MAX 3' UTR	5' . . .UAUUUUUACGUAGAAGCUCUUG. . . 	7mer-m8	-0.30	98	-0.30	3.113	N/A
hsa-miR-335-5p	3' UGUAAAAGCAAUAA-CGAGAACU						

Dentro de las limitantes que tuvimos en la realización de los experimentos y que pudieron influir en los resultados, destaca que se realizó la extracción y purificación de ARN total, debido a que las dos isoformas MAX y  $\Delta$ MAX se pueden localizar tanto en núcleo como en citoplasma y es la fracción nuclear la que pareciera ser más importante (Nair & Burley, 2003). Son por estos motivos que un kit de extracción y purificación de RNA nuclear pudo ser mas informativo en nuestro estudio.

## Conclusión

El Osteosarcoma es el tumor óseo maligno más frecuente. A pesar de los esfuerzos el tratamiento no se ha modificado y por lo tanto la sobrevida no se ha modificado en los últimos 30 años. Una de las principales causas de esto es la falta de entendimiento de su biogénesis y por lo tanto la ausencia de fármacos que actúen de forma específica. En este estudio mostramos la sobre expresión de *MYC*, *MAX* y  $\Delta$ *MAX* en tejido óseo con OS. La regulación directa de *MYC* ha sido previamente explorada sin tener el éxito esperado probablemente por lo complejo de su función e interacción. La regulación de *MAX* y  $\Delta$ *MAX* pueden ser un enfoque terapéutico que vale la pena continuar investigando. Más estudios funcionales son necesarios para analizar la expresión de *MYC*, *MAX* y  $\Delta$ *MAX*, así como de las moléculas que interviene en la regulación de su expresión como en el caso de hnRNPA1.

## Referencias Bibliográficas

1. Abou Ali, B., Salman, M., Ghanem, K. M., Boulos, F., Haidar, R., Saghieh, S., Akel, S., Muwakkit, S. A., El-Solh, H., Saab, R., Tamim, H., & Abboud, M. R. (2019). Clinical Prognostic Factors and Outcome in Pediatric Osteosarcoma: Effect of Delay in Local Control and Degree of Necrosis in a Multidisciplinary Setting in Lebanon. *Journal of Global Oncology*, 5(5), 1–8. <https://doi.org/10.1200/jgo.17.00241>
2. Anderson, M. E. (2016). Update on Survival in Osteosarcoma. In *Orthopedic Clinics of North America* (Vol. 47, Issue 1, pp. 283–292). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.ocl.2015.08.022>
3. Babic, I., Anderson, E. S., Tanaka, K., Guo, D., Masui, K., Li, B., Zhu, S., Gu, Y., Villa, G. R., Akhavan, D., Nathanson, D., Gini, B., Mareninov, S., Li, R., Camacho, C. E., Kurdistani, S. K., Eskin, A., Nelson, S. F., Yong, W. H., ... Mischel, P. S. (2013). EGFR mutation-induced alternative splicing of max contributes to growth of glycolytic tumors in brain cancer. *Cell Metabolism*, 17(6), 1000–1008. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.013>
4. Baena-Ocampo, L. del C., Ramirez-Perez, E., Linares-Gonzalez, L. M., & Delgado-Chavez, R. (2009). Epidemiology of bone tumors in Mexico City: retrospective clinicopathologic study of 566 patients at a referral institution. *Annals of Diagnostic Pathology*, 13(1), 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2008.07.005>
5. Ballinger, M. L., Goode, D. L., Ray-Coquard, I., James, P. A., Mitchell, G., Niedermayr, E., Puri, A., Schiffman, J. D., Dite, G. S., Cipponi, A., Maki, R. G., Brohl, A. S., Myklebost, O., Stratford, E. W., Lorenz, S., Ahn, S. M., Ahn, J. H., Kim, J. E., Shanley, S., ... Thomas, D. M. (2016). Monogenic and polygenic determinants of sarcoma risk: an international genetic study. *The Lancet Oncology*, 17(9), 1261–1271. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30147-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30147-4)

6. Beck, A. (1922). Zur frage des roritgensarkoms, zugleich ein beitrage zur pathogenese des sarkoms. *Munchen Med.*, 69, 623–625.
7. Brown, A. L., Li, M., Goncarenco, A., & Panchenko, A. R. (2019). Finding driver mutations in cancer: Elucidating the role of background mutational processes. *PLoS Computational Biology*, 15(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006981>
8. Castell, A., & Larsson, L. G. (2015). Targeting MYC Translation in Colorectal Cancer. In *Cancer discovery* (Vol. 5, Issue 7, pp. 701–703). Cancer Discov. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0660>
9. Castell, A., Yan, Q., Fawcner, K., Hydbring, P., Zhang, F., Verschut, V., Franco, M., Zakaria, S. M., Bazzar, W., Goodwin, J., Zinzalla, G., & Larsson, L. G. (2018). A selective high affinity MYC-binding compound inhibits MYC:MAX interaction and MYC-dependent tumor cell proliferation. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28107-4>
10. Castillo-Tandazo, W., Mutsaers, A. J., & Walkley, C. R. (2019). Osteosarcoma in the Post Genome Era: Preclinical Models and Approaches to Identify Tractable Therapeutic Targets. In *Current Osteoporosis Reports* (Vol. 17, Issue 5, pp. 343–352). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11914-019-00534-w>
11. Cates, J. M. M. (2018). Simple staging system for osteosarcoma performs equivalently to the AJCC and MSTIS systems. *Journal of Orthopaedic Research*, 36(10), 2802–2808. <https://doi.org/10.1002/jor.24032>
12. Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. In *Environmental and Molecular Mutagenesis* (Vol. 58, Issue 5, pp. 235–263). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/em.22087>
13. Chen, D., Zhao, Z., Huang, Z., Chen, D. C., Zhu, X. X., Wang, Y. Z., Yan, Y. W., Tang, S., Madhavan, S., Ni, W., Huang, Z. P., Li,

- W., Ji, W., Shen, H., Lin, S., & Jiang, Y. Z. (2018). Super enhancer inhibitors suppress MYC driven transcriptional amplification and tumor progression in osteosarcoma. *Bone Research*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0009-8>
14. Chen, X., Bahrami, A., Pappo, A., Easton, J., Dalton, J., Hedlund, E., Ellison, D., Shurtleff, S., Wu, G., Wei, L., Parker, M., Rusch, M., Nagahawatte, P., Wu, J., Mao, S., Boggs, K., Mulder, H., Yergeau, D., Lu, C., ... Dyer, M. A. (2014). Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma. *Cell Reports*, 7(1), 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.003>
  15. Chou, A. J., & Gorlick, R. (2006). Chemotherapy resistance in osteosarcoma: Current challenges and future directions. In *Expert Review of Anticancer Therapy* (Vol. 6, Issue 7, pp. 1075–1085). <https://doi.org/10.1586/14737140.6.7.1075>
  16. de Azevedo, J. W. V., de Medeiros Fernandes, T. A. A., Fernandes, J. V., de Azevedo, J. C. V., Lanza, D. C. F., Bezerra, C. M., Andrade, V. S., de Araújo, J. M. G., & Fernandes, J. V. (2020). Biology and pathogenesis of human osteosarcoma (Review). In *Oncology Letters* (Vol. 19, Issue 2, pp. 1099–1116). Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.11229>
  17. Durfee, R. A., Mohammed, M., & Luu, H. H. (2016). Review of Osteosarcoma and Current Management. *Rheumatology and Therapy*, 3(2), 221–243. <https://doi.org/10.1007/s40744-016-0046-y>
  18. Edge, S. B., Byrd, D. R., Compton, C. C., Fritz, A. G., Greene, F. L., & Tampa, A. T. (2015). American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. In *American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual* (7th ed.). Springer.
  19. ElKordy, M. A., ElBaradie, T. S., ElSebai, H. I., Amin, A. A. E. W., & KhairAlla, S. M. (2018). Osteosarcoma of the jaw: Challenges in the diagnosis and treatment. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 30(1), 7–11.

<https://doi.org/10.1016/j.jnci.2018.02.001>

20. Enneking, W., Spanier, S., & Goodman, M. (1980). A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop Relat Res*, 153, 106–120.
21. FitzGerald, M. J., Arsura, M., Bellas, R. E., Yang, W., Wu, M., Chin, L., Mann, K. K., DePinho, R. A., & Sonenshein, G. E. (1999). Differential effects of the widely expressed dMax splice variant of Max on E-box vs initiator element-mediated regulation by c-Myc. *Oncogene*, 18(15), 2489–2498. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202611>
22. Franceschini, N., Lam, S. W., Cleton-Jansen, A. M., & Bovée, J. V. M. G. (2020). What's new in bone forming tumours of the skeleton? In *Virchows Archiv* (Vol. 476, Issue 1, pp. 147–157). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00428-019-02683-w>
23. Fraumeni, J. (1967). Stature and malignant tumors of bone in childhood and adolescence. *Cancer*, 20(6), 967–973. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(196706\)20:6<967::aid-cncr2820200606>3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/1097-0142(196706)20:6<967::aid-cncr2820200606>3.0.co;2-p)
24. Futreal, P. A., Coin, L., Marshall, M., Down, T., Hubbard, T., Wooster, R., Rahman, N., & Stratton, M. R. (2004). A census of human cancer genes. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 4, Issue 3, pp. 177–183). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc1299>
25. Gelberg, K., Fitzgerald, E., Hwang, S., & Dubrow, R. (1997). Growth and development and other risk factors for osteosarcoma in children and young adults. *Int J Epidemiol*, 26(2), (272-278). <https://doi.org/10.1093/ije/26.2.272>
26. Geller, D. S., & Gorlick, R. (2010). Osteosarcoma: A Review of Diagnosis, Management, and Treatment Strategies. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*, 8(10), 705–718.
27. Gianferante, D. M., Mirabello, L., & Savage, S. A. (2017). Germline and somatic genetics of osteosarcoma - Connecting aetiology, biology and therapy. In *Nature Reviews Endocrinology*

- (Vol. 13, Issue 8, pp. 480–491). Nature Publishing Group.  
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.16>
28. Grimer, R. J. (2005). Surgical options for children with osteosarcoma. *The Lancet. Oncology*, 6(2), 85–92.  
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)01734-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)01734-1)
  29. Han, G., Wang, Y., & Bi, W. (2012). c-Myc overexpression promotes osteosarcoma cell invasion via activation of MEK-ERK pathway. *Oncology Research*, 20(4), 149–156.  
<https://doi.org/10.3727/096504012X13522227232237>
  30. He, H., Ni, J., & Huang, J. (2014). Molecular mechanisms of chemoresistance in osteosarcoma (review). In *Oncology Letters* (Vol. 7, Issue 5, pp. 1352–1362). Spandidos Publications.  
<https://doi.org/10.3892/ol.2014.1935>
  31. Hurlin, P. J., & Huang, J. (2006). The MAX-interacting transcription factor network. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 16, Issue 4, pp. 265–274).  
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.07.009>
  32. Jones, K. B., Salah, Z., Del Mare, S., Galasso, M., Gaudio, E., Nuovo, G. J., Lovat, F., LeBlanc, K., Palatini, J., Randall, R. L., Volinia, S., Stein, G. S., Croce, C. M., Lian, J. B., & Aqeilan, R. I. (2012). miRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma. *Cancer Research*, 72(7), 1865–1877. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2663>
  33. Joseph, C. G., Hwang, H., Jiao, Y., Wood, L. D., Kinde, I., Wu, J., Mandahl, N., Luo, J., Hruban, R. H., Diaz, L. A., He, T. C., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., Mertens, F., & Papadopoulos, N. (2014). Exomic analysis of myxoid liposarcomas, synovial sarcomas, and osteosarcomas. *Genes Chromosomes and Cancer*, 53(1), 15–24. <https://doi.org/10.1002/gcc.22114>
  34. Kager, L., Tamamyian, G., & Bielack, S. (2017). Novel insights and therapeutic interventions for pediatric osteosarcoma. In *Future Oncology* (Vol. 13, Issue 4, pp. 357–368). Future Medicine Ltd.  
<https://doi.org/10.2217/fon-2016-0261>

35. Kaiser, S., Sauer, F., & Kisker, C. (2017). The structural and functional characterization of human RecQ4 reveals insights into its helicase mechanism. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms15907>
36. Kansara, M., Teng, M. W., Smyth, M. J., & Thomas, D. M. (2014). Translational biology of osteosarcoma. *Nature Reviews. Cancer*, 14(11), 722–735. <https://doi.org/10.1038/nrc3838>
37. Klein, M. J., & Siegal, G. P. (2006). Osteosarcoma: Anatomic and histologic variants. In *American Journal of Clinical Pathology* (Vol. 125, Issue 4, pp. 555–581). American Society of Clinical Pathologists. <https://doi.org/10.1309/UC6KQHLD9LV2KENN>
38. Kovac, M., Blattmann, C., Ribi, S., Smida, J., Mueller, N. S., Engert, F., Castro-Giner, F., Weischenfeldt, J., Kovacova, M., Krieg, A., Andreou, D., Tunn, P. U., Dürr, H. R., Rechl, H., Schaser, K. D., Melcher, I., Burdach, S., Kulozik, A., Specht, K., ... Baumhoer, D. (2015). Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms9940>
39. Li, X., Zhang, Y., Wan, S., Li, H., Li, D., Xia, J., Yuan, Z., Ren, M., Yu, S., Li, S., Yang, Y., Han, L., & Yang, Z. (2016). A comparative study between limb-salvage and amputation for treating osteosarcoma. In *Journal of Bone Oncology* (Vol. 5, Issue 1, pp. 15–21). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2016.01.001>
40. Li, Y., Meng, G., Huang, L., & Guo, Q. N. (2009). Hypomethylation of the P3 promoter is associated with up-regulation of IGF2 expression in human osteosarcoma. *Human Pathology*, 40(10), 1441–1447. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.03.003>
41. Link, M., Goorin, A., Horowitz, M., Meyer, W., J. B., & A. B. (1991). Adjuvant chemotherapy of high-grade osteosarcoma of the extremity. Updated results of the Multi-Institutional Osteosarcoma Study. *Clin Orthop Relat Res*, 270, 8–14.

42. Lu, J., & Wang, J. (2015). IRX1 hypomethylation in osteosarcoma metastasis. In *Oncotarget* (Vol. 6, Issue 19, pp. 16802–16803). Impact Journals LLC. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4696>
43. Mäkelä, T. P., Koskinen, P. J., Västrik, I., & Alitalo, K. (1992). Alternative forms of Max as enhancers or suppressors of Myc-Ras cotransformation. *Science*, 256(5055), 373–377. <https://doi.org/10.1126/science.256.5055.373>
44. Marcozzi, A., Pellestor, F., & Kloosterman, W. P. (2018). The Genomic Characteristics and Origin of Chromothripsis. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 1769, 3–19. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7780-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7780-2_1)
45. Marina, N. M., Smeland, S., Bielack, S. S., Bernstein, M., Jovic, G., Krailo, M. D., Hook, J. M., Arndt, C., van den Berg, H., Brennan, B., Brichard, B., Brown, K. L. B., Butterfass-Bahloul, T., Calaminus, G., Daldrup-Link, H. E., Eriksson, M., Gebhardt, M. C., Gelderblom, H., Gerss, J., ... Whelan, J. S. (2016). Comparison of MAPIE versus MAP in patients with a poor response to preoperative chemotherapy for newly diagnosed high-grade osteosarcoma (EURAMOS-1): an open-label, international, randomised controlled trial. *The Lancet Oncology*, 17(10), 1396–1408. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30214-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30214-5)
46. Marulanda, G. A., Henderson, E. R., Johnson, D. A., Letson, G. D., & Cheong, D. (2008). Orthopedic surgery options for the treatment of primary osteosarcoma. In *Cancer Control* (Vol. 15, Issue 1, pp. 13–20). H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute. <https://doi.org/10.1177/107327480801500103>
47. McAllister, K. A., Houle, C. D., Malphurs, J., Ward, T., Collins, N. K., Gersch, W., Wharey, L., Seely, J. C., Betz, L., Bennett, L. M., Wiseman, R. W., & Davis, B. J. (2006). Spontaneous and irradiation-induced tumor susceptibility in Brca2 germline mutant mice and cooperative effects with a p53 germline mutation. *Toxicologic Pathology*, 34(2), 187–198.

<https://doi.org/10.1080/01926230600611794>

48. Merchant, A., Smielewska, M., Patel, N., Akunowicz, J. D., Saria, E. A., Delaney, J. D., Leach, R. J., Seton, M., & Hansen, M. F. (2009). Somatic mutations in SQSTM1 detected in affected tissues from patients with sporadic paget's disease of bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, 24(3), 484–494. <https://doi.org/10.1359/jbmr.081105>
49. Mirabello, L., Pfeiffer, R., Murphy, G., Daw, N. C., Patiño-Garcia, A., Troisi, R. J., Hoover, R. N., Douglass, C., Schüz, J., Craft, A. W., & Savage, S. A. (2011). Height at diagnosis and birth-weight as risk factors for osteosarcoma. *Cancer Causes and Control*, 22(6), 899–908. <https://doi.org/10.1007/s10552-011-9763-2>
50. Misaghi, A., Goldin, A., Awad, M., & Kulidjian, A. (2018). Osteosarcoma: A Comprehensive Review. *SICOT-J*, 4. <https://doi.org/10.1051/SICOTJ/2017028>
51. Monterde-Cruz, L., Ramírez-Salazar, E. G., Rico-Martínez, G., Linares-González, L. M., Guzmán-González, R., Delgado-Cedillo, E., Estrada-Villaseñor, E., Valdés-Flores, M., Velázquez-Cruz, R., & Hidalgo-Bravo, A. (2020). MicroRNA expression in relation with clinical evolution of osteosarcoma. *Pathology Research and Practice*, 216(8), 153038. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153038>
52. Moore, D. D., & Luu, H. H. (2014). Osteosarcoma. *Cancer Treatment and Research*, 162, 65–92. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-07323-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-07323-1_4)
53. Moriarity, B. S., Otto, G. M., Rahrmann, E. P., Rathe, S. K., Wolf, N. K., Weg, M. T., Manlove, L. A., Larue, R. S., Temiz, N. A., Molyneux, S. D., Choi, K., Holly, K. J., Sarver, A. L., Scott, M. C., Forster, C. L., Modiano, J. F., Khanna, C., Hewitt, S. M., Khokha, R., ... Largaespada, D. A. (2015). A Sleeping Beauty forward genetic screen identifies new genes and pathways driving osteosarcoma development and metastasis. *Nature Genetics*,

- 47(6), 615–624. <https://doi.org/10.1038/ng.3293>
54. Nair, S. K., & Burley, S. K. (2003). X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA: Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. *Cell*, *112*(2), 193–205. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01284-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01284-9)
55. Ottaviani, G., & Jaffe, N. (2009). The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treatment and Research*, *152*, 3–13. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0284-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0284-9_1)
56. Perry, J. A., Kiezun, A., Tonzi, P., Van Allen, E. M., Carter, S. L., Baca, S. C., Cowley, G. S., Bhatt, A. S., Rheinbay, E., Pedamallu, C. S., Helman, E., Taylor-Weiner, A., McKenna, A., DeLuca, D. S., Lawrence, M. S., Ambrogio, L., Sougnez, C., Sivachenko, A., Walensky, L. D., ... Janeway, K. A. (2014). Complementary genomic approaches highlight the PI3K/mTOR pathway as a common vulnerability in osteosarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(51), E5564–E5573. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419260111>
57. Rickel, K., Fang, F., & Tao, J. (2017). Molecular genetics of osteosarcoma. *Bone*, *102*, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.10.017>
58. Ritter, J., & Bielack, S. S. (2010). Osteosarcoma. *Annals of Oncology*, *21*, 320–325. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq276>
59. Rodríguez-Franco, J. H., Técualt-Gómez, R., Amaya-Zepeda, R. A., Atencio-Chan, A., Cario-Méndez, A. G., & González-Valladares, R. (2016). Comportamiento epidemiológico del osteosarcoma en la población mexicana entre 2005 y 2014. *Rev Asoc Argent Ortop Traumatol*, *81*(3), 219–226. <https://doi.org/10.15417/542>
60. SALAH, S., AHMAD, R., SULTAN, I., YASER, S., & SHEHADEH, A. (2014). Osteosarcoma with metastasis at initial diagnosis: Current outcomes and prognostic factors in the context of a comprehensive cancer center. *Molecular and Clinical*

- Oncology*, 2(5), 811–816. <https://doi.org/10.3892/mco.2014.325>
61. Sayles, L. C., Breese, M. R., Koehne, A. L., Leung, S. G., Lee, A. G., Liu, H. Y., Spillinger, A., Shah, A. T., Tanasa, B., Straessler, K., Hazard, F. K., Spunt, S. L., Marina, N., Kim, G. E., Cho, S. J., Avedian, R. S., Mohler, D. G., Kim, M. O., Dubois, S. G., ... Sweet-Cordero, E. A. (2019). Genome-informed targeted therapy for osteosarcoma. *Cancer Discovery*, 9(1), 46–63. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-1152>
62. Schaub, F. X., Dhankani, V., Berger, A. C., Trivedi, M., Richardson, A. B., Shaw, R., Zhao, W., Zhang, X., Ventura, A., Liu, Y., Ayer, D. E., Hurlin, P. J., Cherniack, A. D., Eisenman, R. N., Bernard, B., Grandori, C., Caesar-Johnson, S. J., Demchok, J. A., Felau, I., ... Mariamidze, A. (2018). Pan-cancer Alterations of the MYC Oncogene and Its Proximal Network across the Cancer Genome Atlas. *Cell Systems*, 6(3), 282-300.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.03.003>
63. Sharma, S., Kelly, T., & Jones, P. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 27–36. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp220>.
64. Smeland, S., Bielack, S. S., Whelan, J., Bernstein, M., Hogendoorn, P., Krailo, M. D., Gorlick, R., Janeway, K. A., Ingleby, F. C., Anninga, J., Antal, I., Arndt, C., Brown, K. L. B., Butterfass-Bahloul, T., Calaminus, G., Capra, M., Dhooge, C., Eriksson, M., Flanagan, A. M., ... Marina, N. (2019). Survival and prognosis with osteosarcoma: outcomes in more than 2000 patients in the EURAMOS-1 (European and American Osteosarcoma Study) cohort. *European Journal of Cancer*, 109, 36–50. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.11.027>
65. Steffner, R. J., & Jang, E. S. (2018). Staging of Bone and Soft-Tissue Sarcomas. In *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* (Vol. 26, Issue 13, pp. E269–E278). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.5435/JAAOS-D-17-00055>

66. Tabone, M. D., Kalifa, C., Rodary, C., Raquin, M., Valteau-Couanet, D., & Lemerle, J. (1994). Osteosarcoma recurrences in pediatric patients previously treated with intensive chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 12(12), 2614–2620. <https://doi.org/10.1200/JCO.1994.12.12.2614>
67. Urban, V., Dobrovolna, J., & Janscak, P. (2017). Distinct functions of human RecQ helicases during DNA replication. *Biophysical Chemistry*, 225, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2016.11.005>
68. Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer genome landscapes. In *Science* (Vol. 340, Issue 6127, pp. 1546–1558). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1235122>
69. Vu, L., Vathaire, D., Shamsaldin, M.M., H., E., G., C., H., I., D., G., V., E., B., S., C., X., P., N., D.-S., J.-L., L., J.-M., Z., F., E., J., C., J., L., Le Vu, B., de Vathaire, F., ... Lemerle, J. (1998). Radiation dose, chemotherapy and risk of osteosarcoma after solid tumours during childhood. *International Journal of Cancer*, 77(3), 370–377. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19980729\)77:3<370::AID-IJC11>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19980729)77:3<370::AID-IJC11>3.0.CO;2-C) LK - <http://vu.on.worldcat.org/atoztitles/link?sid=EMBASE&issn=00207136&id=doi:10.1002%2F%28SICI%291097-0215%2819980729%2977%3A3%3C370%3A%3AAID-IJC11%3E3.0.CO%3B2-C&atitle=Radiation+dose%2C+chemotherapy+and+risk+of+osteosarcoma+after+solid+tumours+during+childhood&stitle=Int.+J.+Cancer&title=International+Journal+of+Cancer&volume=77&issue=3&spage=370&epage=377&aualast=Le+Vu&aufirst=B%2C%29atrice&aunit=B.&aufull=Le+Vu+B.&coden=IJCNA>
70. Whelan, J., Bielack, S., Marina, N., Smeland, S., Jovic, G., & Hook, J. (2015). EURAMOS-1, an international randomised study for osteosarcoma: results from pre-randomisation treatment. *Ann*

- Oncol*, 26(2), 407–414. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu526>.
71. Whitfield, J. R., Beaulieu, M. E., & Soucek, L. (2017). Strategies to inhibit Myc and their clinical applicability. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 5, Issue FEB, p. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00010>
72. Wu, L. C., Kleinerman, R. A., Curtis, R. E., Savage, S. A., & Berrington De González, A. (2012). Patterns of bone sarcomas as a second malignancy in relation to radiotherapy in adulthood and histologic type. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 21(11), 1993–1999. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-12-0810>
73. Xie, Y., Deng, H., Wei, R., Sun, W., Qi, Y., Yao, S., Cai, L., Wang, Y., & Deng, Z. (2019). Overexpression of miR-335 inhibits the migration and invasion of osteosarcoma by targeting SNIP1. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.016>
74. Zhang, J., Walsh, M. F., Wu, G., Edmonson, M. N., Gruber, T. A., Easton, J., Hedges, D., Ma, X., Zhou, X., Yergeau, D. A., Wilkinson, M. R., Vadodaria, B., Chen, X., McGee, R. B., Hines-Dowell, S., Nuccio, R., Quinn, E., Shurtleff, S. A., Rusch, M., ... Downing, J. R. (2015). Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 373(24), 2336–2346. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1508054>
75. Zhang, Y., Zhang, L., Zhang, G., Li, S., Duan, J., Cheng, J., Ding, G., Zhou, C., Zhang, J., Luo, P., Cai, D., Kuang, L., Zhou, Y., Tong, L., Yu, X., Zhang, L., Xu, L., Yu, L., Shi, X., & Ke, A. (2014). Osteosarcoma metastasis: Prospective role of ezrin. *Tumor Biology*, 35(6), 5055–5059. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1799-y>

## **Anexos**

### **Recursos materiales**

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

### **Aspectos bioéticos y de bioseguridad**

Este proyecto forma parte de una investigacion mayor, el cual fue aprobado a los Comites de Investigacion y Etica del Instituto Nacional de Rehabilitacion, Luis Guillermo Ibarra Ibarra.

Este proyecto es de riesgo minimo

## Carta de Consentimiento Informado (Pacientes mayores de 18 años)

Fecha \_\_\_\_\_ Numero de registro \_\_\_\_\_

---

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

Carta de consentimiento informado para la participacion voluntaria en el proyecto de investigacion medica titulado: "Identificacion de miRNAs como marcadores biologicos para la respuesta al tratamiento y/o desarrollo de metastasis en tumores oseos", que se realizara en el servicio de Genetica del Instituto Nacional de Rehabilitacion "Luis Guillermo Ibarra Ibarra".

### Justificacion del estudio:

El osteosarcoma de alto grado tiene una tasa de sobrevida a 5 anos del 70% y no ha sido posible mejorarla en los ultimos 20 anos. Esto se debe, en gran medida, a la capacidad que tiene el tumor de generar metastasis rapidamente, es decir propagarse a traves de la sangre a otras partes del cuerpo, y a que en un numero considerable de casos los medicamentos administrados no tienen el efecto deseado, porque el tumor es resistente a su accion. Los estudios de laboratorio con los que se cuenta actualmente para manejar estos dos aspectos del comportamiento del tumor son limitados, y no han logrado mejorar la sobrevida. El manejo de los pacientes representa actualmente una gran inversion de recursos humanos y economicos para el sistema de salud. Se sabe que cuando existen algunas enfermedades el cuerpo produce sustancias o elementos que pueden ser detectadas en lfquidos corporales, como la sangre o la orina, estas sustancias pueden ser utiles para diagnosticar la enfermedad o conocer la etapa en la que se encuentra. Estas sustancias son llamadas marcadores biologicos por su capacidad de relacionarse a una enfermedad. Es necesario descubrir nuevos marcadores biologicos que puedan asociarse con la respuesta al tratamiento, o a la presencia de metastasis en los pacientes con osteosarcoma. La evidencia actual sugiere que los miRNAs (elementos generados por el cuerpo bajo condiciones normales o de enfermedad que pueden ser liberadas a la sangre) tienen el potencial de ser utilizados como marcadores biologicos. Ademas, son elementos que pueden obtenerse por metodos de minima invasion, como una extraccion de sangre. La magnitud de este estudio es que puede ayudar a desarrollar nuevas herramientas podrfan tener un efecto positivo en la calidad de vida de los pacientes y contribuirfan a mejorar la tasa de sobrevida. Tambien se lograrfa un mejor uso de los recursos humanos y economicos destinados al tratamiento de estos pacientes. Ademas de ser utiles como biomarcadores, estos elementos nos pueden ayudar a comprender mejor el comportamiento del tumor, lo cual puede sentar las bases para nuevas estrategias de tratamiento.

### Consentimiento:

Se le invita a participar de manera completamente voluntaria en el proyecto de investigacion a cargo del Dr. Alberto Hidalgo Bravo, investigador del Instituto Nacional de Rehabilitacion (INR) adscrito al servicio de genetica. El objetivo de la investigacion es encontrar factores utiles como herramienta de diagnostico para la conocer el desarrollo de metastasis y respuesta al tratamiento en pacientes con osteosarcoma.

Su participacion consiste en lo siguiente: durante la cirugía programada para el tratamiento del tumor,

se tomara una muestra de tejido proveniente del tumor y otra muestra de tejido sano de la region adyacente al tumor. La toma de tejido sera solo en una ocasion y no implica un riesgo extra durante el procedimiento quirurgico. Ademas, entre 12 y 24 horas antes de la cirugía se realizara una toma de muestra de sangre venosa (20 mililitros), con el proposito de obtener el suero de la sangre periferica, para posteriormente extraer el RNA. La toma de la muestra de sangre puede ser incomoda y en ocasiones puede resultar en un pequeno moreton en el sitio de puncion y en raras ocasiones, puede ocurrir una infeccion. La muestra de sangre se tomara solo en una ocasion. Aunque no se le soliciten nuevas muestras, los medicos que participan en la investigacion daran seguimiento a la evolucion de su enfermedad para conocer la respuesta a su tratamiento, o saber si hubo desarrollo de metastasis. Este seguimiento se hara consultando su expediente clinico y hasta que usted sea dado de alta.

El tratamiento que usted reciba o tenga programado en esta Institucion no se vera modificado en ningun sentido si usted decide no participar en la investigacion. Tambien le informamos que los procedimientos que se realicen para este estudio no le generaran ningun costo extra. Debido a que este estudio no implica procedimientos extras, a los ya programados para su manejo, no se ofrece un tratamiento medico o indemnizacion por danos derivados de su participacion en este estudio.

Su confidencialidad sera protegida dentro de la ley y sera mantenida por asignacion de un codigo de numeros para toda su informacion. La clave de este codigo sera bloqueado y solo algunos miembros autorizados del equipo de investigacion tendra acceso al codigo de identificacion.

Usted no recibira ningun tipo de remuneracion por su participacion en el estudio. Los diferentes resultados de los analisis moleculares podran ser publicados de manera anonima en revistas de difusion científica y que de momento no tienen utilidad en la asistencia medica. Los resultados de esta investigacion pueden no representar un beneficio inmediato para el manejo de su enfermedad, sin embargo, es posible que sirvan como base para el desarrollo de futuros metodos de diagnostico y/o seguimiento para personas con la misma condicion medica. Si usted desea conocer los resultados de la investigacion puede consultarlos con el investigador responsable.

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

Al firmar esta carta de consentimiento acepto de participar voluntariamente y comprendo que por mi participacion no recibire beneficio economico ni de ningun otro tipo y se me ha informado que puedo declinar la invitacion a participar en cualquier momento y esto no afectara la calidad de atencion que recibo en el instituto.

Si usted tiene algun problema, pregunta, duda y aclaracion o reclamacion acerca de la investigacion, no dude en ponerse en contacto con el Dr. Alberto Hidalgo Bravo del Instituto Nacional de Rehabilitacion (tel. 59991000 ext. 19405. En caso de duda sobre sus derechos, el participante puede consultar al Comité de Ética en Investigación del INR, telefono 59991000 ext. 18342.

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

---

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

---

Domicilio:

---

Testigo 1

Testigo 2

Nombre

---

Nombre

---

Firma

---

Firma

---

Relacion con el paciente de estudio

---

Relacion con el paciente de estudio

---

Nombre y firma del responsable de la toma de muestra: \_\_\_\_\_

## Consentimiento para resguardo de muestras y uso en futuros estudios

Se propone que las muestras colectadas formen parte de un banco de muestras resguardado en el Instituto Nacional de Rehabilitación. Estas muestras podran ser utilizadas por los investigadores involucrados en el proyecto, en futuros estudios que persigan una meta en comun al presente estudio. Acepto que las muestras queden bajo resguardo de los investigadores involucrados en el presente proyecto y sean utilizadas en estudios con objetivos comunes al presente estudio. Se me ha explicado que en caso de no acceder al resguardo de las muestras estas no podran ser utilizadas en nuevos estudios y seran destruidas al concluir el presente estudio.

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

---

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

---

Domicilio: \_\_\_\_\_

Testigo 1

Testigo 2

\_\_\_\_\_  
Nombre

\_\_\_\_\_  
Nombre

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Relacion con el paciente de estudio

\_\_\_\_\_  
Relacion con el paciente de estudio

Nombre y firma del responsable de la toma de muestra: \_\_\_\_\_

## Carta de Consentimiento Informado (Pacientes menores de 18 años)

Fecha \_\_\_\_\_ Numero de registro \_\_\_\_\_

---

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

Carta de consentimiento informado para la participacion voluntaria en el proyecto de investigacion medica titulado: "Identificacion de miRNAs como marcadores biologicos para la respuesta al tratamiento y/o desarrollo de metastasis en tumores oseos", que se realizara en el servicio de Genetica del Instituto Nacional de Rehabilitacion "Luis Guillermo Ibarra Ibarra".

### Justificacion del estudio:

El osteosarcoma de alto grado tiene una tasa de sobrevivida a 5 anos del 70% y no ha sido posible mejorarla en los ultimos 20 anos. Esto se debe, en gran medida, a la capacidad que tiene el tumor de generar metastasis rapidamente, es decir propagarse a traves de la sangre a otras partes del cuerpo, y a que en un numero considerable de casos los medicamentos administrados no tienen el efecto deseado, porque el tumor es resistente a su accion. Los estudios de laboratorio con los que se cuenta actualmente para manejar estos dos aspectos del comportamiento del tumor son limitados, y no han logrado mejorar la sobrevivida. El manejo de los pacientes representa actualmente una gran inversion de recursos humanos y economicos para el sistema de salud. Se sabe que cuando existen algunas enfermedades el cuerpo produce sustancias o elementos que pueden ser detectadas en lfquidos corporales, como la sangre o la orina, estas sustancias pueden ser utiles para diagnosticar la enfermedad o conocer la etapa en la que se encuentra. Estas sustancias son llamadas marcadores biologicos por su capacidad de relacionarse a una enfermedad. Es necesario descubrir nuevos marcadores biologicos que puedan asociarse con la respuesta al tratamiento, o a la presencia de metastasis en los pacientes con osteosarcoma. La evidencia actual sugiere que los miRNAs (elementos generados por el cuerpo bajo condiciones normales o de enfermedad que pueden ser liberadas a la sangre) tienen el potencial de ser utilizados como marcadores biologicos. Ademias, son elementos que pueden obtenerse por metodos de minima invasion, como una extraccion de sangre. La magnitud de este estudio es que puede ayudar a desarrollar nuevas herramientas podrfan tener un efecto positivo en la calidad de vida de los pacientes y contribuirfan a mejorar la tasa de sobrevivida. Tambien se lograrfa un mejor uso de los recursos humanos y economicos destinados al tratamiento de estos pacientes. Ademias de ser utiles como biomarcadores, estos elementos nos pueden ayudar a comprender mejor el comportamiento del tumor, lo cual puede sentar las bases para nuevas estrategias de tratamiento.

**Consentimiento:**

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

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

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

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

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

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

Al firmar esta carta de consentimiento acepto que mi hijo participe voluntariamente y comprendo que por su participacion no recibiremos beneficio economico ni de ningun otro tipo. Se me ha informado que puedo declinar la invitacion a que mi hijo participe en cualquier momento y esto no afectara la calidad de atencion que reciba en el instituto.

Si usted tiene algun problema, pregunta, duda y aclaracion o reclamacion acerca de la investigacion, no dude en ponerse en contacto con el Dr. Alberto Hidalgo Bravo del Instituto Nacional de Rehabilitacion (tel. 59991000 ext. 19405. En caso de duda sobre sus derechos, el participante puede consultar al Comite de Etica en Investigacion del INR, telefono 59991000 ext. 18342.

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

---

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

---

Domicilio: \_\_\_\_\_

Testigo 1

Testigo 2

\_\_\_\_\_  
Nombre

\_\_\_\_\_  
Nombre

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Relacion con el paciente de estudio

\_\_\_\_\_  
Relacion con el paciente de estudio

Nombre y firma del responsable de la toma de muestra: \_\_\_\_\_

**Consentimiento para resguardo de muestras y uso en futuros estudios**

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

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

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

\_\_\_\_\_

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

\_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

Testigo 1

Testigo 2

\_\_\_\_\_  
Nombre

\_\_\_\_\_  
Nombre

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Relacion con el paciente de estudio

\_\_\_\_\_  
Relacion con el paciente de estudio

Nombre y firma del responsable de la toma de muestra: \_\_\_\_\_



