

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
LICENCIATURA EN PROMOCIÓN DE LA SALUD

Secuenciación de nueva generación para la identificación de variantes de predisposición de cáncer pediátrico desde una perspectiva de la promoción de la salud. Estudio de un caso raro de fibrosarcoma de ovario

TRABAJO RECEPCIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN PROMOCIÓN DE LA SALUD

PRESENTA

KAREN JAZMIN RUIZ MONROY

Directora de trabajo recepcional

DRA. GABRIELA ELISA MERCADO CELIS

Codirectora de trabajo recepcional

DRA. Ma. GUADALUPE DE DIOS BRAVO

CIUDAD DE MEXICO, agosto 2017

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



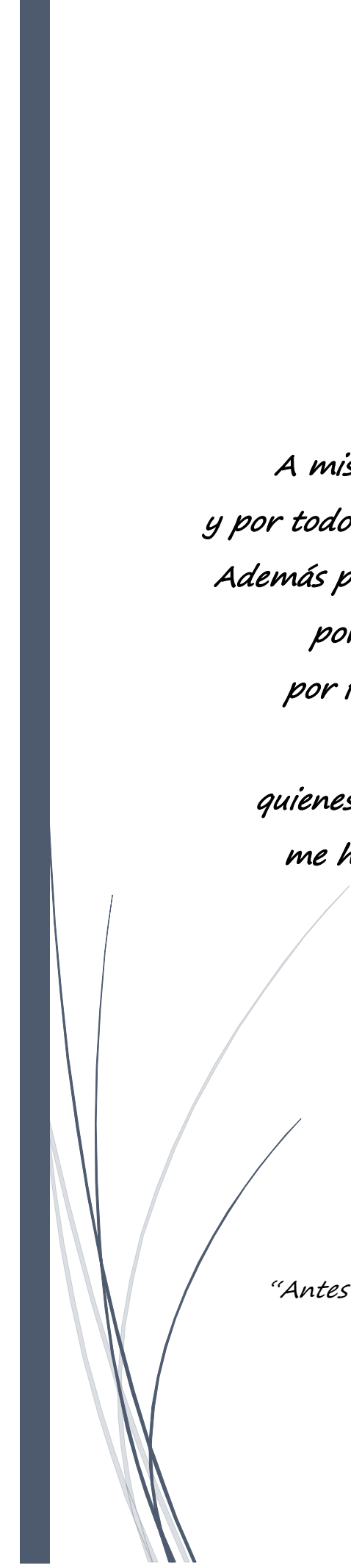
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.



*A mis padres: por haber confiado en mí,
y por todo el apoyo que siempre me han brindado.
Además por creer en mí y secar mis malos ratos,
por ser una motivación en mi vida,
por formarme y guiarme en el camino.*

*Para mis hermanos:
quienes con su apoyo y muestras de cariño,
me han motivado para seguir adelante.*

*“Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las estrellas.
Ahora sabemos que está en nuestros genes”*

JAMES WATSON

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gabriela Elisa Mercado Celis por haberme brindado la oportunidad de trabajar con ella, por transmitirme su conocimiento y por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Ma. Guadalupe De Dios Bravo por ser una guía en mi formación, por sus valiosas enseñanzas, por su grata colaboración y consejos sobre este trabajo.

Al INMEGEN y UNAM por permitirme estar ahí realizando mi trabajo.

A los miembros del jurado la Dra. Martha Margarita Zapata Torres, a la Dra. Ma. Elena Duran Lizárraga, al Dr. Israel López Reyes y al Mtro. Miguel Ángel Palomino Garibay, por tomarse el tiempo de leer el presente trabajo y por los comentarios hechos al respecto.

A mi apreciada Universidad Autónoma de la Ciudad de México, por permitirme tener una nueva oportunidad de estudiar.

A mi querido Miguel Ángel Martínez García quien ha sido más que mi mejor amigo y mi inspiración de cada día, por haberme ayudado y por haber cuidado de mí.

A mi apreciable Jenny Flores encargada del laboratorio, quién me proporcionó todo lo necesario para el análisis de muestras, por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio y por compartirme su conocimiento.

A la familia de la paciente le doy mi más grande agradecimiento por permitir acercarme a ellos y conocer su caso.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE TABLAS	5
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	6
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	8
PROMOCIÓN DE LA SALUD	8
IMPORTANCIA DE LA MEDICINA GENÓMICA.....	12
AVANCES EN EL CONOCIMIENTO DEL GENOMA HUMANO Y MEDICINA GENÓMICA	13
SECUENCIACIÓN DE NUEVA GENERACIÓN COMO UNA HERRAMIENTA PARA LA MEDICINA GENÓMICA, VISTA DESDE LA PERSPECTIVA DE LA PROMOCIÓN A LA SALUD	14
CÁNCER PEDIÁTRICO COMO PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA EN MÉXICO	17
FACTORES DE RIESGO RELACIONADOS CON CÁNCER PEDIÁTRICO.....	18
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	24
OBJETIVOS	24
OBJETIVO GENERAL:	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	24
MATERIAL Y MÉTODOS	26
PACIENTES.....	26
<i>Criterios de Inclusión, Exclusión, Eliminación</i>	26
RECOLECCIÓN Y TOMA DE MUESTRAS	27
EXTRACCIÓN DE ADN Y ARN	28
CUANTIFICACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD	28
CONTROL DE CALIDAD PARA SECUENCIACIÓN	28
GENOTIPIFICACIÓN AFFYMETRIX SNP 6.0	29
SECUENCIACIÓN DE EXOMA Y GENOMA.....	30
<i>Construcción de Genotecas</i>	31
<i>Preparación de genotecas para amplificación de clusters y secuenciación</i>	32
<i>Amplificación de Clusters y Secuenciación</i>	32
SECUENCIACIÓN DE ARN.....	32
<i>Construcción de la genoteca de ADNc</i>	33
<i>Preparación de genotecas para la amplificación y secuenciación de clúster</i>	33
RESULTADOS	34
POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	34
ANTECEDENTES FAMILIARES DE CÁNCER	39

PRESENTACIÓN DEL CASO	45
ÁRBOL FAMILIAR.	47
CRITERIOS HISTOPATOLÓGICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE FIBROSARCOMA DE OVARIO.....	49
<i>DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:</i>	50
CRITERIOS HISTOPATOLÓGICOS DEL TUMOR DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA JUVENIL	52
<i>DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA</i>	53
SECUENCIACIÓN DE EXOMA.....	54
SECUENCIACIÓN DE ARN.....	56
EXTRACCIÓN ARN	57
RESULTADOS DE LA INTEGRIDAD DEL ARN (BIOANALYZER 2100).....	58
MUTACIONES SOMÁTICAS	59
TASA DE MUTACIÓN	59
MUTACIONES DELETÉREAS	61
ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS (CNVs)	63
TRANSCRIPTOMA DEL FIBROSARCOMA DE OVARIO.....	65
REGIONES NO CODIFICANTES	67
LNCARNs EN FIBROSARCOMA DE OVARIO	68
<i>Mutaciones Germinales</i>	71
DISCUSIÓN	73
SECUENCIACIÓN DE LA MUESTRA	76
MUTACIONES ENCONTRADAS	77
SÍNDROME DE DICER1	77
GEN NF1	80
ALTERACIONES EN CROMOSOMAS 8, 10, 17	80
GEN MYC.....	81
GEN TP53	82
GEN GLI1	83
CONCLUSIONES	87
PERSPECTIVAS	89
GLOSARIO.....	90
ANEXOS.....	92
ANEXO I CUESTIONARIO	92
ANEXO II PROTOCOLOS	94
<i>EXTRACCIÓN DE DNA CON KIT PUREGENE</i>	94
<i>Aislamiento de ARN AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, cat. 80204)</i>	95
REFERENCIAS.....	98

ÍNDICE TABLAS

<i>Tabla 1. Plataformas de secuenciación.</i>	15
<i>Tabla 2. Síndromes Asociados a Cáncer Pediátrico</i>	19
<i>Tabla 3. Características sociodemográficas.</i>	36
<i>Tabla 4. Distribución de casos por diagnóstico histopatológico.</i>	37
<i>Tabla 5. Frecuencia de Antecedentes de Cáncer en la Familia.</i>	40
<i>Tabla 6. Indicadores de predisposición genética</i>	41
<i>Tabla 7. Número de criterios positivos en casos.</i>	43
<i>Tabla 8. Resultados obtenidos de la extracción de ADN de tejido y sangre periférica de la paciente.</i>	55
<i>Tabla 9. Resultados de Cobertura y Calidad de Secuenciación de Exoma</i>	56
<i>Tabla 10. Pureza y concentraciones de RNA.</i>	57
<i>Tabla 11. Integridad del ARN (RIN).</i>	58
<i>Tabla 12. Gen, clase y tipo de variación y efecto.</i>	61
<i>Tabla 13. LincRNAs mutado; Cr. Cromosoma; Inicio y fin: Ubicación del gen; Tipo de variación: INS: inserción; DEL: Delección</i>	68
<i>Tabla 14. lincARNs. Relacionados con cáncer, presentes en el tumor</i>	70

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<i>Figura 1. Distribución de casos por sexo.....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 2. Distribución de casos por grupo de edad.</i>	<i>35</i>
<i>Figura 3. Distribución de casos por diagnóstico histopatológico.....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 4. Distribución de casos por tipo de tumor.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 5. Historia Familiar.</i>	<i>40</i>
<i>Figura 6. Historia Familiar.</i>	<i>42</i>
<i>Figura 7. Ultrasonido del tumor de la paciente.</i>	<i>46</i>
<i>Figura 8. Árbol Familiar.</i>	<i>48</i>
<i>Figura 9. Histopatología de Fibrosarcoma.</i>	<i>50</i>
<i>Figura 10. Histopatología de fibrosarcoma de ovario.....</i>	<i>52</i>
<i>Figura 11. A. Tumor de las células de la granulosa juvenil con áreas hemorrágicas y áreas solidas de color amarillo. B. Histopatología del tumor de las células de la granulosa juvenil, con células fusiformes ovaladas y hendidas.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 12. La calidad del ARN.</i>	<i>58</i>
<i>Figura 13. Alteraciones genéticas encontradas en el fibrosarcoma de ovario.....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 14. Alteraciones en el gen DICER1.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 15. Mutaciones en el gen NF1.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 16. Alteraciones cromosómicas.....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 17. Función de enriquecimiento en tres categorías.....</i>	<i>65</i>
<i>Figura 18. Cascada transcripcional del gen MYC.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 19. Vía Hedgehog (Hh), expresión de GLI1.....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 20. Frecuencia de LincARN en comparación de fibroblastomas control con la muestra de fibrosarcoma.</i>	<i>69</i>
<i>Figura 21. lincARNs expresados en fibrosarcoma de ovario de la paciente, en relación a cáncer.....</i>	<i>69</i>
<i>Figura 22. Secuenciación de Sanger tumoral y germinal.</i>	<i>71</i>
<i>Figura 23. Secuencia en cadena de nucleótido.</i>	<i>71</i>
<i>Figura 24. Secuenciación de sanger en la familia.</i>	<i>72</i>
<i>Figura 25. Localización del gen DICER1, cromosoma 14.....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 26. Localización de NF1 en el cromosoma 17.</i>	<i>80</i>
<i>Figura 27. Localización de MYC en el cromosoma 8.</i>	<i>81</i>
<i>Figura 28. Localización del TP53 en el cromosoma 17.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 29. Localización del gen GLI1 en el cromosoma 12.</i>	<i>83</i>

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ASC-H	Células escamosas atípicas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SNPs	Polimorfismo de un solo nucleótido
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
AML	Anticuerpos antimúsculo liso
APC	Adenomatous polyposis coli
mg	Microgramos
mL	mililitros
ng	nanogramos
pb	Pares de bases
μl	microlitros
BRCA2	Breast Cancer Type 2 susceptibility protein
BSP	Plataforma de muestras biológicas
EMA	Antígeno epitelial de membrana
DEL	Deleción
IHQ	Análisis de inmunohistoquímica
INMEGEN	Instituto Nacional de Medicina Genómica
INP	Instituto Nacional de Pediatría.
INS	Inserción
LLA	Leucemia linfocítica aguda
NaOH	Hidroxido de sodio
EMA	Antígeno epitelial de membrana
OMIM	Herencia Mendeliana en el Hombre
OMS	Organizacion Mundial de la Salud
pM	Peso molecular
PMS2	Mismatch Repair Protein
RB1	Retinoblastoma 1
RIN	Número de integridad de ARN
SNC	Sistema Nervioso Cetral
SNG	Next-Generation Sequencing
SNV	Variación de un solo nucleótido
TAC	Tomografía computarizada

Promoción de la Salud

En la actualidad, la salud es el resultado de una compleja interacción que involucra las condiciones geográficas, culturales, políticas y económicas que caracterizan a cada sociedad, ya que la enfermedad en tiempos pasados era vista como un castigo divino, y solo los religiosos podían atenderla, pasando el tiempo esta concepción de salud-enfermedad cambió (Kuri-Morales, 2011), se fueron creando los hospitales y profesionales de la salud, dando lugar a que la salud se conceptualizara solo como la ausencia de enfermedad, pero en la actualidad este concepto ha cambiado, la salud es el resultado de todo lo que rodea al ser humano, desde la enfermedad que le aqueja hasta la forma en que se alimenta, vive, duerme, trabaja, etc.

Debido a lo anterior, la promoción de la salud nace ante las necesidades que se han ido presentando a lo largo del tiempo en la sociedad, al igual que la medicina ha evolucionado a través de la adquisición de nuevos conocimientos del complejo salud-enfermedad-paciente. Cabe mencionar que, las tendencias sanitarias, como las tendencias políticas y organizativas, han ido conformando la Promoción de la Salud, así como la investigación clínica y básica que ha generado conocimiento para poder establecer mejores propuestas para la promoción de la salud.

Si se habla de la promoción se puede decir que es un conjunto de acciones articuladas y orientadas a una finalidad específica, asimismo a facilitar el acceso a algo, mientras que Salud según la Organización Mundial de la Salud (OMS) es un estado completo de bienestar físico, mental y social y no solo la ausencia de afecciones o enfermedades, por lo tanto la

promoción de la salud consiste en proporcionar a los pueblos los medios necesarios para mejorar la salud y ejercer un mayor control sobre la misma (Canales, 2014; WHO, 1986).

Dicho lo anterior, la Promoción de la Salud desde sus inicios propone el desarrollo progresivo de intervenciones dirigidas a ganar salud y a prevenir las enfermedades, ya que las sociedades modernas afrontan desde finales del siglo pasado dos retos íntimamente relacionados, la transición demográfica y la transición epidemiológica, que supone un cambio de las enfermedades transmisibles a las no trasmisibles a medida que aumenta la esperanza de vida de una población (*Estrategia de promoción de salud y prevención en el SNS, 2014*).

La promoción es un conjunto de acciones articuladas y orientadas a una finalidad específica, asimismo a facilitar el acceso a algo, mientras que Salud según la Organización Mundial de la Salud (OMS) es un estado completo de bienestar físico, mental y social y no solo la ausencia de afecciones o enfermedades, por lo tanto la promoción de la salud consiste en proporcionar a los pueblos los medios necesarios para mejorar la salud y ejercer un mayor control sobre la misma (Canales, 2014; WHO, 1986).

Las políticas de salud tratan de reorientar los servicios sanitarios para responder de forma efectiva a las nuevas necesidades de salud de la sociedad. El papel de la promoción de la salud es fundamental en el desarrollo de dichas políticas (*Estrategia de promoción de salud y prevención en el SNS, 2014*).

A partir de la convención de Alma Ata en 1976 que conceptualiza la salud en un plano más integral y sistémico se reconoce más claramente la relación entre individuos enfermos y poblaciones enfermas, así como el reconocimiento de la importancia de los distintos

sectores del desarrollo en salud y calidad de vida revelando la necesidad del trabajo multidisciplinario en salud e intersectorial ya que el reconocimiento de la variedad y distintas dimensiones de los determinantes hace imposible a un solo sector asumir la responsabilidad técnica y político estratégico (Osorio-Solache, 2014).

En base a lo expuesto anteriormente, los determinantes sociales para la promoción de la salud son estilo de vida que puede ser afectado por amplias fuerzas sociales, económicas y políticas que influyen en la calidad de la salud personal, también incluyen el empleo el nivel de ingresos y la distribución, la vivienda, el desarrollo infantil, la seguridad alimentaria y la nutrición, la raza, el género y el estrés. Se ha demostrado que dichos factores tienen asociaciones marcadas con los riesgos para diferentes enfermedades, la esperanza de vida y la morbilidad y mortalidad (Braveman, Egerter S Fau - Williams, & Williams), esto se resumiría en servicios sanitarios, medio ambiente, estilos de vida y biología humana, por tanto aquí es donde esta tesis empieza a tomar mayor importancia porque como se menciona anteriormente un determinante importante es el desarrollo infantil.

Los rumbos estratégicos que se toman como base son los que propone la carta de Ottawa e incluyen (*Planificación Local Participativa. Metodologías para la Promoción de la Salud en América Latina y el Caribe*, 1999):

1. La elaboración de políticas saludables.
2. El fortalecimiento de la organización y participación comunitaria.
3. El desarrollo de habilidades personales.
4. La creación de ambientes saludables.

5. La reordenación de los servicios de salud.

En resumen, la Promoción de la Salud tiene un papel importante en la atención a la salud y constituye una estrategia que ayuda a las personas a generar una mayor relación con sus entornos con vistas a crear un futuro más saludable. Combina la elección personal con la responsabilidad social y que como principio abarca a toda la población en el contexto de que exista una participación comunitaria efectiva en la definición de los problemas, en la toma de decisiones y en las medidas emprendidas para modificar y mejorar los factores determinantes de la salud. Por esta razón la promoción requiere de una cooperación estrecha entre todos los sectores de la sociedad, incluido el gobierno, con vistas a asegurar que el entorno global promueva la salud (WHO, 1986) .

Una de las finalidades de la Salud Pública y de la Promoción de la Salud, es realizar intervenciones sociales y ambientales destinadas a beneficiar y proteger la salud y la calidad de vida de las personas, algunas veces mediante la prevención y solución de las causas primordiales de los problemas de salud, lo que es importante implementar herramientas que nos ayuden a generar esas finalidades, y una herramienta muy interesante sería la investigación a través de la medicina genómica.

En relación con lo anterior la medicina genómica tiene diversas aplicaciones como es la investigación de genética forense, diagnóstico clínico como el diagnóstico de enfermedades monogénicas, vigilancia de enfermedades infecciosas, etc.; por tanto como ya se sabe la vigilancia epidemiológica y el diagnóstico oportuno de enfermedades están ligadas a la Salud Pública y sus acciones a la promoción de la salud, en consecuencia lo importante sería que el

concepto de promoción de la salud se centrare en la promoción general de la salud pública de la población.

Importancia de la medicina genómica

A través de la historia de la humanidad, el estudio del cuerpo humano y sus enfermedades que se han ido desarrollando durante el ciclo de la vida, han sido una de las investigaciones más complejas y nuevas áreas de investigación han dado respuesta a algunas preguntas sobre su origen. Una de las nuevas áreas de investigación es la medicina genómica, la cual tiene como objetivo mejorar el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades a través del análisis de la secuencia de ADN y ARN de cada ser humano.

La medicina genómica estudia la asociación de las variaciones en la secuencia del genoma con la predisposición a enfermedades comunes y raras, así como su influencia en la respuesta a tratamientos (Collins, Green, Guttmacher, Guyer, & Institute, 2003). Las aportaciones de la genómica han permitido empezar a comprender los factores genéticos que participan en el origen de las enfermedades, así como intentar entender el efecto que también tienen los factores ambientales (Guttmacher & Collins, 2002). Por tanto la medicina genómica es un gran potencial de desarrollo para la promoción de la salud, ya que se mejoraría la atención médica, con intervenciones preventivas, selecciones terapéuticas y tratamiento individualizado basados en el conocimiento de los aspectos genéticos y los factores ambientales que determinan el desarrollo, progresión y respuesta a tratamiento de enfermedades comunes (Epstein, 2006).

La medicina genómica nos enfrenta a nuevos retos éticos, legales y sociales que son inherentes al uso de información confidencial de cada paciente. Algunos de ellos

relacionados con la toma de decisiones de participar en estudios genómicos por el temor de que los resultados podrían dañar su integridad por la posibilidad de que esta información pueda dar lugar a la discriminación o estigmatización de las personas por sus características genómicas (Clayton, 2003). También deben discutirse otros aspectos tales como el desarrollo de la tecnología y el análisis de datos, las particularidades en la legislación y regulación sanitaria de cada país, ya que todos los pacientes tienen derecho a la privacidad y confidencialidad de sus datos.

Avances en el conocimiento del genoma humano y medicina genómica

En los años 70 comienza el auge de la manipulación del ADN generando tecnologías recombinantes, así como también se dan avances en bioquímica, biología molecular, ingeniería genética y biotecnología, los cuales abrieron el camino para el desarrollo del método para la secuenciación y el mapeo del genoma humano. En 1985 se realiza la primera propuesta para secuenciar el genoma humano. El 1 de octubre de 1990, esta iniciativa se consolidó dando inicio así, al proyecto científico tecnológico más importante de finales del siglo XX, el Proyecto del Genoma Humano, el cual culminó en abril del 2003 (Institute, 2010).

Por otra parte, la medicina genómica está orientada a la identificación de las variaciones del genoma humano de individuos para ofrecer una atención a la salud más individualizada, predictiva y preventiva. Ahora bien, la medicina personalizada clasifica a los individuos en subpoblaciones, por lo que, podría en un futuro permitir realizar intervenciones relacionadas con la prevención, dando como resultado la disminución del costo de la atención a largo plazo; en caso de enfermedad poder afinar el diagnóstico e implementar el mejor tratamiento con el fin de mejorar la efectividad del mismo y disminuir efectos adversos

(Medrano-Hernández, 2012). México tiene una gran diversidad genética en su población, poder asociar estas variaciones con predisposición a enfermedades de gran impacto en la salud pública, como el cáncer, la diabetes, la hipertensión, diferentes tipos de neoplasias, será útil para desarrollar estrategias para el análisis genético y de esta manera se podría tratar de mejorar la atención sanitaria de su población a través de la promoción de la salud (Silva-Zolezzi et al., 2009).

Se dice que la medicina genómica va más allá de la salud, porque además de impulsar el desarrollo científico y tecnológico para generar nuevas estrategias en salud, tendrá un impacto económico muy importante al reducir los costos en la atención a las enfermedades como el cáncer. Asimismo, generará nuevos productos y servicios, a la atención en salud (Collins et al., 2003). Es por ello, que la medicina genómica podría ser vista desde la perspectiva de la promoción de la salud como un instrumento en el diagnóstico de enfermedades, que aquejan en la Salud Pública.

Secuenciación de Nueva Generación como una herramienta para la Medicina Genómica, vista desde la perspectiva de la Promoción a la Salud

Los espectaculares avances que se han presentado en la Bioquímica, la Biología Molecular, la Ingeniería Genética y la Biotecnología abrieron el camino para incursionar en un método que ha impactado en el conocimiento del genoma: la secuenciación. El surgimiento de la tecnología para el desciframiento del genoma humano empezó con el método enzimático de terminación de cadenas (método de los didesoxinucleótidos) creado por Sanger, sin embargo, los avances en los últimos años han conducido al desarrollo de la secuenciación de nueva generación (NGS).

Las nuevas plataformas tienen la capacidad de secuenciar millones de fragmentos de ADN de forma paralela a un precio mucho más barato por base. Los secuenciadores de nueva generación no requieren clonación de los fragmentos de ADN, se realizan miles a millones de reacciones de secuenciación en paralelo. La secuenciación masiva tiene la ventaja de poder detectar todos los tipos de variación genómica en un genoma, incluyendo variantes de nucleótido único o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones, y también variantes estructurales tanto equilibradas (inversiones y translocaciones) como desequilibradas (deleciones o duplicaciones) (Gonzaga-Jauregui, Lupski Jr Fau - Gibbs, & Gibbs). En la tabla 1 podemos ver una comparación de distintas plataformas de secuenciación masiva paralela, que actualmente existen en el mercado. Las distintas plataformas se basan en técnicas diferentes y utilizan distintos métodos para la preparación, en el estudio se utilizó la metodología de Illumina.

Tabla 1. Plataformas de secuenciación.

	Equipo	Compañía	Método de secuenciación	ADN molde	Longitud de lecturas (pb)	Tiempo de carrera (h)
<i>2ª Generación de secuenciación</i>	GS-FLX (454)	Roche	Polimerasa (porosecuenciación)	PCR Emulsión	250-400	10
	SOLEXA	Illumina	Polimerasa (terminadores reversibles)	PCR Puente	35-75	48
	ABI SOLID	Aplied Biosystems	Ligasa (octámeros con código de dos bases)	PCR Emulsión	25-75	168
<i>3ª Generación de secuenciación</i>	Helicos tSMS	Helicos BioSciences	Polimerasa	Molécula única	25-45	192
	Pacific Biosciences	Pacific Biosciences	Polimerasa	Molécula única	1000	NA
	ZX Genetics	ZX Genetics	Microscopía electrónica	Molécula única	NA	NA

La tabla muestra una comparación de las distintas plataformas de secuenciación.

Fuente: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros128/comofunciona128.pdf> (Bautista-Moreno, 2010)

La medicina es un saber práctico que para algunos cuyo fin es solo la curación de la enfermedad, aliviar el dolor, etc., es aquí donde esta tesis sigue tomando importancia con la búsqueda de los resultados genéticos, pues se puede demostrar la eficacia del uso de esta herramienta, mediante las estrategias o la perspectiva de la promoción de la salud mencionadas anteriormente, que nos podría ayudar a prevenir las enfermedades o a generar mejores diagnósticos, tratamientos y terapias para mejorar la salud y la calidad de vida de la población. Es importante tener en cuenta que a medida que se inician los estudios de secuenciación orientados a la población, resulta necesario determinar los problemas que se presentan al generar y analizar los datos producidos (Harismendy et al., 2009).

Con lo dicho anteriormente se podría decir que este estudio toma valor para la promoción de la salud, ya que, ha surgido la necesidad en la población de conocer realmente el origen de la enfermedad que afecta a sus hijos o a ellos mismos, desde ese contexto el promotor de la salud puede fungir como investigador, en la búsqueda de nuevos resultados obtenidos a partir de los estudios genéticos de los pacientes para tratar de responder sus preguntas y ayudar a las personas a obtener un mayor conocimiento de las enfermedades o síndromes que se podrían presentar.

Por ejemplo, algunos han sugerido que la NGS podría ser utilizada para secuenciar el genoma o exoma de todos los niños que nacen para poder identificar alteraciones genéticas que afecten o pudieran afectar en un futuro al recién nacido. En Estados Unidos al momento hay cuatro estudios financiados para establecer la utilidad de la NGS en recién nacidos (Buermans & den Dunnen, 2014).

Cáncer Pediátrico como problema de salud pública en México

Según la OMS, en el mundo el cáncer pediátrico es un problema de salud pública desde 1990, ya que a nivel mundial se estima que cada año se diagnostican 15 casos de cáncer infantil por cada 100.000 niños menores de 15 años (CeNSIA, 2015). En México, en la actualidad, el cáncer en la población pediátrica de 0 a 18 años de edad, representa un grave problema de salud pública siendo una de la primera causa de muerte por enfermedad en los menores de 18 años (Rivera-Luna, 2015).

A diferencia de muchas neoplasias malignas de adultos, la mayoría de los cánceres pediátricos no están asociados con factores de riesgo modificables y no son susceptibles a los programas de detección y prevención basados en la población (Gupta, Rivera-Luna, Ribeiro, & Howard, 2014). El cáncer pediátrico es biológicamente diferente al cáncer en adultos, en primer lugar, los tipos más frecuentes en pacientes pediátricos son las leucemias, linfomas y tumores del sistema nervioso central (SNC) (CeNSIA, 2015), en adultos la frecuencia más elevada se encuentra en carcinomas de pulmón, colon, mama, próstata y páncreas. Sabemos que algunos tipos de cáncer son más frecuentes en edad pediátrica como es el caso del Tumor de Wilms, sin embargo también se puede diagnosticar en adolescentes o adultos, pero es extremadamente raro (Szychot, Apps, & Pritchard-Jones, 2014).

Por otra parte, hasta el momento no se han identificado factores ambientales que puedan predisponer a cáncer pediátrico, por lo tanto, no existen medidas preventivas que puedan ser aplicadas para disminuir la frecuencia de este padecimiento. Los pacientes pediátricos son más propensos a sufrir los efectos secundarios de los tratamientos para cáncer como

son disfunción cognitiva, cataratas, cardiopatía, etc., así como la posibilidad de desarrollar segundas neoplasias. Sin embargo la probabilidad de sobrevivir al cáncer es mayor que en niños que adultos (Navajas & Peris, 2007).

Factores de riesgo relacionados con cáncer pediátrico.

Diversos autores han sugerido que el cáncer en niños resulta de alteraciones en el genoma que ocurren muy tempranamente en el desarrollo, o causados por mutaciones en línea germinal que puede transmitirse a la descendencia. De los síndromes de cáncer hereditario la mayoría se transmite mediante un patrón de herencia autosómica dominante (el alelo alterado es dominante sobre el normal y basta de una sola copia para que se exprese la enfermedad). Esta susceptibilidad implica un riesgo aumentado respecto a la población general de desarrollar cáncer, que dependiendo del síndrome que consideremos variará en función de su penetrancia (Robles et al., 2013).

El cáncer por mutaciones germinales es más posible que se presente a una edad más temprana, se caracteriza por agrupamientos familiares, mayor frecuencia de afectación bilateral o multifocal unilateral, tumores en diferentes órganos, mayor riesgo de segundas neoplasias, y normalmente, asociados con otras manifestaciones fenotípicas en forma de síndromes. En el caso de síndromes asociados a cáncer pediátrico, la mayoría es causada por mutaciones en genes supresores de tumores (Tortajada, 1999). Se propone que es más fácil inactivar genes que activarlos y además este tipo de mutaciones son bien toleradas por el embrión. Estas mutaciones predisponen a cáncer, pero requieren otros eventos para completar el fenotipo. Hay varios síndromes de predisposición genética que se han descrito, algunos ejemplos se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Síndromes Asociados a Cáncer Pediátrico

Síndrome	Entrada OMIM	Los principales tipos de tumores	Modo de herencia	Genes
14:95,086,227 14q32.13 DICER1, homólogo de Drosophila,	606241	Rabdomiosarcoma, embrionario, Blastoma pleuropulmonar células de Sertoli-Leydig	Dominante	<i>DICER1</i>
Poliposis adenomatosa del colon	175100	Colon, tiroides, estómago, intestino, hepatoblastoma	Autosómico Dominante	<i>APC</i>
Poliposis juvenil	174900	Gastrointestinal	Dominante	<i>SMAD4 / DPC4</i>
El síndrome de Peutz-Jeghers	175200	Intestinal, de ovario, de páncreas	Dominante	<i>STK11</i>
Síndrome de Gorlin	109400	Piel, meduloblastoma	Dominante	<i>PTCH</i>
La neurofibromatosis tipo 1 La neurofibromatosis tipo 2	162200 101000	Neurofibroma, glioma de la vía óptica, tumor de vaina nerviosa periférica Schwannoma vestibular	Dominante	<i>NF1</i> <i>NF2</i>
Esclerosis tuberosa	191100	Angiomiolipoma renal, carcinoma de células renales	Dominante	<i>TSC1 / TSC2</i>
Xeroderma pigmentoso (7 genes (XPA a XPG).	278730,	De piel o melanoma, leucemia, linfomas.	Recesivo	<i>XPA, B, C, D, E, F, G, polh</i>
Síndrome de Rothmund Thomson	268400	Piel, hueso	Recesivo	<i>RECQL4</i>
Síndrome de Bloom (gen BLM)	210900	La leucemia, linfoma, de piel, carcinomas.	Recesivo	<i>BLM</i>
Anemia de Fanconi	227650	Leucemia, carcinoma de células escamosas, sistema ginecológico	Recesivo	<i>FANCA, B, C, D₂, E, F,</i>
Síndrome de rotura Nijmegen	251260	Linfoma, meduloblastoma, glioma	Recesivo	<i>NBS1</i>
Síndrome Teleangiectasia Ataxia	208900	La leucemia, el linfoma, tumores del SNC.	Recesivo	
Síndrome Num Simpson-	312870	Tumores embrionarios,	Ligada al	<i>GPC3</i>

Golabi-Behmel && 131;		tumor de Wilms	cromosoma X	
Síndrome de Von Hippel-Lindau	193300	Hemangioblastoma nerviosa retiniana y central, feocromocitoma, carcinoma de células renales	Dominante	<i>BVS</i>
Síndrome de Beckwith-Wiedemann	130650	El tumor de Wilms, hepatoblastoma, carcinoma suprarrenal, rabdomiosarcoma	Dominante	<i>CDKN1C / NSD1</i>
Síndrome de tumor de Wilms	194070	El tumor de Wilms	Dominante	<i>WT1</i>
Síndrome de WAGR	194072	El tumor de Wilms, gonadoblastoma	Dominante	<i>WT1</i>
Retinoblastoma	180200	El retinoblastoma, osteosarcoma	Dominante	<i>RB1</i>
Síndrome de predisposición a tumores rabdoide	601607	Tumor rabdoide, meduloblastoma, tumor de plexo coroide		<i>SNF5 / INI1</i>
Síndrome de Li-Fraumeni (gen TP53)	151623	Sarcoma de tejidos blandos, osteosarcoma, de mama, carcinoma adrenocaortical, leucemia, tumor cerebral, tumores de tiroides.	Dominante	<i>TP53</i>
Exostosis múltiple (genes EXT1-3)	133700, 133701	El condrosarcoma	Dominante	<i>EXT1 / EXT2</i>
Síndrome de Werner	277700	Osteosarcoma, meningioma	Recesivo	<i>WRN</i>
MEN 1	131000	Pancreático tumor de células de los islotes, adenoma hipofisario, adenoma de paratiroides	Dominante	<i>MEN1</i>
MEN 2	171400	Carcinoma medular de tiroides, feocromocitoma, hiperplasia paratiroidea	Dominante	<i>RETIRADO</i>

OMIM, herencia mendeliana en el hombre. La tabla muestra varios síndromes de predisposición genética y que tiene que ver con múltiples tipos de cáncer. Elaboración propia (**Medicine, 2017**)

Recientemente Zhang J y Cols (2015). Publicaron un estudio donde se reporta la frecuencia de mutaciones germinales en pacientes diagnosticados con cáncer pediátrico. Se estudiaron aproximadamente 1000 pacientes menores de 20 años, se analizaron las secuencias de 565 genes, incluyendo 60 asociados con síndromes de cáncer autosómicos dominantes. Los datos fueron comparados con 966 personas sin cáncer del proyecto de 1000 genomas (Zhang et al., 2015). Los resultados mostraron que el 8.5% de los pacientes tienen alguna mutación germinal patogénica o posiblemente patogénica y los genes más mutados fueron TP53, APC, BRCA2, NF1, PMS2, RB1 y RUNX1. Los autores concluyeron que la historia familiar en estos pacientes no puede predecir la presencia de un síndrome de predisposición a cáncer.

En cuanto a factores ambientales, se desconocen casi completamente, por lo tanto, no se han podido establecer medidas de prevención. Sin embargo sabemos que los niños son especialmente vulnerables a los carcinógenos, presentando un riesgo de 10 veces mayor al esperado en adultos durante los dos primeros años de vida y tres veces mayor entre 3-15 años (Ortega-García, 2003). La promoción de la salud juega un papel fundamental al dar a conocer los factores ambientales que afectan y que deben evitarse, tratando de generar conciencia en los individuos de la gravedad de su exposición.

JUSTIFICACIÓN

Desde hace mucho tiempo el cáncer ha acompañado a la humanidad, aunque esta palabra no era utilizada o se desconocía la enfermedad, sigue siendo el resultado de la interacción de factores genéticos y factores externos (físicos y químicos), que producen la transformación de las células, originando lesiones precancerosas y finalmente tumores malignos, que se localizan en algún órgano o tejido, y pueden diseminarse a otros órganos generando una metástasis.

El cáncer infantil tiene gran importancia en el ámbito de la Salud Pública, ya que actualmente en México se estima que existen anualmente entre 5 mil y 6 mil casos nuevos de cáncer en menores de 18 años. El cáncer infantil es la principal causa de muerte por enfermedad en mexicanos entre 5 y 14 años de edad, conforme a las cifras preliminares 2013 reportadas en el Sistema Estadístico Epidemiológico de las Defunciones (SEED) (CeNSIA, 2015). A nivel mundial el cáncer infantil es una de las primeras causas de mortalidad en el grupo de edad de los 0 a los 19 años (Steliarova-Foucher et al., 2017).

De la misma forma se dice que en México a partir del primer año de vida, el cáncer es la segunda causa de mortalidad infantil tras los accidentes (CeNSIA, 2015). Los casos de cáncer pediátrico han ido en aumento en las últimas décadas. Sin embargo, gracias a los avances en el tratamiento entre el 50 a 80% de los pacientes sobreviven, aunque estos porcentajes pueden variar de acuerdo al tipo de cáncer (team, 2016).

La identificación de mutaciones germinales en pacientes con cáncer hereditario es de gran importancia para la identificación de pacientes con un riesgo elevado de desarrollar cáncer,

ya que hay una serie de alteraciones genéticas que predisponen al desarrollo de determinados tumores en la infancia, el reconocimiento del cáncer hereditario en los pacientes puede tener grandes implicaciones para el tratamiento y la prevención de la enfermedad, no sólo para el paciente sino también para los familiares (Robson et al., 2010).

Por otra parte los costos de la SNG están disminuyendo progresivamente, por ejemplo se estimó que la primer secuenciación del genoma humano fue de 2.7 mil millones de dólares en un tiempo de 13 años, y actualmente el costo para generar una secuencia de todo el exoma es de 1,000 dólares por lo tanto, su utilización se está volviendo más accesible ((LSAC), 2016). Los estudios de SNG han sido particularmente exitosos para la identificación de genes asociados a enfermedades, aun con solo uno o pocos casos. Hasta el momento, por el costo, estos estudios se realizan a través de la secuenciación de exoma, pero en poco tiempo también podrá realizarse secuenciación de genoma completo (Buermans & den Dunnen, 2014).

HIPÓTESIS

La frecuencia de mutaciones germinales puede ser elevada en pacientes pediátricos con cáncer aun sin antecedentes de cáncer en la familia, la identificación adecuada de estos casos por medio de secuenciación de nueva generación y junto con la ayuda de un cuestionario de predisposición genética y con la determinación del contexto bio-psico-socio-demográfico y otros factores de riesgo presentes, nos permitirá clasificar a las familias más vulnerables a padecer esta enfermedad y ayudar en las labores preventivas en nuestra población, a través de la promoción de la Salud.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar la predisposición de cáncer pediátrico a través de la aplicación de un cuestionario genético y mediante la aplicación de la secuenciación de nueva generación para determinar la frecuencia de mutaciones germinales predisponentes de cáncer en pacientes diagnosticados con cáncer pediátrico y analizar el contexto bio-psico-demográfico y algunos factores de riesgo, de esta manera proponer nuevas perspectivas desde la Promoción de la Salud.

Objetivos específicos:

- Determinar la predisposición de cáncer pediátrico a través de la aplicación de un cuestionario genético en pacientes con diagnóstico de cáncer pediátrico.
- Identificar las mutaciones germinales en una paciente con diagnóstico de cáncer pediátrico.

- Determinar la frecuencia de mutaciones germinales en pacientes con diagnóstico de cáncer pediátrico.
- Tratar de vincular la medicina personalizada desde la perspectiva de la Promoción de la Salud para la prevención de cáncer

Pacientes

El presente estudio es parte del proyecto “Genoma del Cáncer, Capítulo México”, que se realizó en el INMEGEN en colaboración con el Instituto Broad MIT/Harvard. Como parte del estudio se recolectaron muestras de sangre y tumor en pacientes pediátricos diagnosticados con cáncer en el Hospital Infantil de México Federico Gómez. Los pacientes y sus padres fueron invitados a participar en el estudio y previo a la toma de las muestras los padres firmaron un consentimiento informado y, en su caso, los pacientes firmaron también un consentimiento informado. El estudio fue revisado y autorizado por las comisiones de Ética del Instituto Nacional de Pediatría (INP) y del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Criterios de Inclusión, Exclusión, Eliminación

Los criterios que se tomaron en cuenta para la selección:

◆ Inclusión

- La edad pediátrica que comprende desde el nacimiento hasta los 18 años de edad del paciente.
- Pacientes con diagnóstico de algún cáncer pediátrico y que haya sido confirmado por patología.
- Pacientes con y sin antecedentes de cáncer.

- Consentimiento informado firmado por padres o tutores y los niños de 12 años o mayores firman del consentimiento informado.

- ◆ **Exclusión**

- Pacientes que su condición clínica no permitía la toma de muestras para el estudio.

- ◆ **Eliminación**

- Aquellos padres o pacientes que decidieran ya no seguir participando en el proyecto.
- Muestra insuficiente o de mala calidad para extraer el ADN.

Recolección y toma de muestras

Las muestras de tejido primario del tumor se obtuvieron durante la resección o toma de biopsia del tumor de los pacientes como parte de su tratamiento y para realizar el diagnóstico correspondiente, además se solicitó una muestra de sangre periférica (2 tubos 6 ml cada uno) algunas se centrifugaron y se separó el plasma del suero.

Las muestras de tejido primario fueron almacenadas a -80 °C y las de sangre a -20 hasta el momento de su procesamiento. En el caso de los familiares se obtuvieron muestras de sangre periférica (2 tubos 6 ml cada uno) del padre, madre y hermanos.

Los registros clínicos de los pacientes fueron revisados, recogiendo los datos siguientes: edad, historia ginecológica, antecedentes personales y familiares, fecha de diagnóstico, estudios de extensión, tratamientos incluyendo, procedimientos quirúrgico y quimioterapia. Por otra parte, se revisaron los datos anatómo-patológicos disponibles.

Extracción de ADN y ARN

El ADN de sangre de la paciente fue extraído empleando “buffy coats” utilizando el kit “Puregene blood” (Qiagen). En el caso de las muestras de tejido, la extracción de ADN se realizó utilizando el kit “DNAesy Blood & Tissue”. Los protocolos fueron realizados de acuerdo a las sugerencias del fabricante.

Para el aislamiento del ARN, se realizó un corte de muestra de 30mg la cual fue colocada en hielo seco para evitar su descongelación. El ARN fue extraído utilizando el kit “AllPrep ADN/ARN Mini” (Qiagen), de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Cuantificación y Control de calidad

La cuantificación del ADN y ARN se realizó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND 1000, con lo que se determinó la cantidad de nanogramos totales y la concentración, para evaluar la pureza de la muestra se calcularon las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230. La integridad del ADN se verificó por electroforesis utilizando geles de agarosa 1%. En el caso de la muestra de ARN la integridad fue evaluada con el bioanalizador Agilent 2100.

Control de calidad para Secuenciación

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

1. Asignación de identificador a través de un código de barras genético
2. Cuantificación por espectrofotometría utilizando el kit “Quant-iT™ PicoGreen®”, las muestras > 1 µg y 60ng/µl se consideraron muestras adecuadas para secuenciación

del genoma/exoma y su integridad se rectificó valorando su calidad en gel; las muestras con excesiva degradación fueron excluidas.

3. Asignación de una “huella digital genética” a través de identificar 23 SNPs de alta frecuencia más un ensayo de género de genotipo en cada muestra utilizando la plataforma Sequenom massArray para lo que se requieren 150ng de ADN, de cada muestra.

Genotipificación Affymetrix SNP 6.0

Se realizó la genotipificación del ADN a través del arreglo de Affymetrix SNP 6.0 para establecer la concordancia del genotipo tumoral con el genotipo de la muestra pareada de tejido normal, además de ofrecer datos sobre la calidad de la muestra. El microarreglo SNP 6.0 está diseñado para detectar 906,600 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y contiene más de 946,000 sondas para la detección de variantes de número de copia. A continuación se describe brevemente el protocolo:

Un total de 500 ng de ADN genómico, es dividido en dos tubos de reacción de 250 ng cada uno y el ADN se digiere con las enzimas de restricción Sty y Nsp, para disminuir la complejidad y redundancia genómica. Los fragmentos generados se ligan a un adaptador específico para cada uno de los productos de digestión que reconoce los extremos cohesivos de 4 pb generados luego del tratamiento con las enzimas de restricción. El adaptador permite que todos los fragmentos sean reconocidos por un primer universal y las muestras se someten a una PCR para la amplificación de los fragmentos de 200 a 1,100 pb. Los productos de PCR se purifican utilizando perlas magnéticas. El producto obtenido de la purificación se fragmenta utilizando una ADNsa. El fragmentado se marca con un residuo

terminal unido a biotina y la muestra se hibrida al microarreglo durante 16-18 horas a 50 °C. El microarreglo se lava de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante y se tiñe con un conjugado de estreptavidina marcada con fluoresceína. El microarreglo una vez lavado y teñido, se coloca en el escáner de alta resolución de la plataforma de Affymetrix.

Secuenciación de Exoma y Genoma

Para la secuenciación se requiere de la ruptura del ADN en fragmentos de distintos tamaños que posteriormente se unirán a extremos de moléculas llamadas adaptadores, el junto de estos fragmentos y los adaptadores se conoce como genotecas (bibliotecas). En breve, 250 ng de ADN de las muestras fueron utilizados para la construcción de genotecas, las cuales fueron secuenciadas con el equipo de Illumina HiSeq 2000 utilizando lecturas de 76-bp bidireccionales (paired-end). Los resultados del software de Illumina fueron procesados con el Picard data-processing pipeline para dar archivos BAM (Binary Alignment/Map format) que contienen lecturas calibradas y alineadas. Todos los procesos se realizaron con instrumentos de manejo de líquidos automatizados, y el seguimiento de la información de las muestras fue realizado por un LIMS (Laboratory Information Management System) automatizado.

Para la secuenciación de exoma y genoma se realizó la fragmentación del ADN y ligación de adaptadores, posteriormente se realizó una amplificación en puente y marcaje por fluorescencia de nucleótidos modificados como terminadores reversibles. Uno de los adaptadores de los extremos de los fragmentos de ADNc se ligó complementariamente a oligonucleótidos adheridos a una superficie sólida o flowcell, estos oligonucleótidos se unen a los primers o cebadores sentido o antisentido, y crean puentes que favorecen la

amplificación de la muestra. Una vez formados estos grupos se desnaturalizan nuevamente para iniciar la polimerización o síntesis de cada fragmento.

Los terminadores reversibles que son dideoxinucleótidos detienen la síntesis de ADN una vez que la ADN polimerasa integrada a la cadena naciente el nucleótido correspondiente. Seguido de la síntesis, los fluoróforos de los terminadores reversibles integrados a la cadena naciente son activados por un láser. La emisión de luz será diferencial de acuerdo con el nucleótido incorporado. La información se registró y almacenó. Una vez hecha la detección, fue lavado retirando los dideoxinucleótidos no integrados y enzimáticamente fue cortado el terminador para que así un nuevo ciclo permita la incorporación del siguiente nucleótido. Una vez obtenida la imagen se eliminó la fluorescencia, y se desbloqueó el carbono 3' de modo que pudiera aceptar una nueva base para continuar la reacción de secuenciación, haciendo que la incorporación de un nucleótido terminador fuera reversible.

Construcción de Genotecas

Las genotecas se construyeron utilizando el siguiente protocolo: se realizó una dilución del ADN genómico inicial 3 µg a 100 ng en 50µL de solución. Los adaptadores de Illumina “paired end” fueron reemplazados con adaptadores “palindromic forked” con 8 bases únicas embebidas dentro del adaptador (index). Estas secuencias index permiten hacer un “pooling” de genotecas antes de la secuenciación. Los kits para preparación de muestras de Kapa Biosciences fueron utilizados para todos los pasos enzimáticos en el proceso de construcción de genotecas. Se realizó selección de híbridos en solución (para las librerías de exomas) como se describe previamente (Fisher et al., 2011).

Preparación de genotecas para amplificación de clusters y secuenciación

Después de la preparación de la muestra, las genotecas fueron cuantificadas utilizando PicoGreen. Posteriormente las genotecas fueron normalizadas y se realizó una mezcla (Pool) volumen a volumen. Los pools de la genotecas fueron cuantificados utilizando un ensayo de qPCR Sybr Green, con primers de PCR complementarios a las terminaciones de los adaptadores (Kapa Biosciences). Después de la cuantificación de qPCR, los pools de la genotecas fueron normalizados a 2nM, desnaturalizados usando 0.2 N NaOH, y diluidos a 20pM.

Amplificación de Clusters y Secuenciación

La finalidad de amplificar los clusters es porque depende de la cantidad obtenida se decide si la corrida de secuenciación se hace o se detiene y se vuelve a realizar, ya que mínimo deben de tener 150 mil clusters. La amplificación de clusters y secuenciación de los templados (hebra anticodificadora de ADN) desnaturalizados se realizó de acuerdo al protocolo del fabricante (Illumina) usando el v3 cluster amplification kit, v3 flowcells, v3 Sequencing-by-Synthesis kits, Multiplexing Sequencing Primer kits, y la última versión del software RTA de Illumina.

Secuenciación de ARN

Se empleó el secuenciador NextSeq 500 (Illumina), para la preparación de genotecas se utilizó el protocolo del kit TruSeq RNA SamplePrep v2 (Illumina).

Construcción de la genoteca de ADNc

Para empezar a construir la genotecas se realizó una dilución del ARN para tener una concentración final de 400 ng en 5 μ l. Para preparar y generar la genotecas, en primer lugar, se fragmentó el ARN mediante hidrólisis química y se seleccionaron los fragmentos de 72 pb. El RNA se convierte en una genoteca de fragmentos de ADNc con adaptadores en uno o ambos extremos. Estos adaptadores son incorporados durante el proceso de amplificación de la genoteca de ADNc. El adaptador en dirección 3' posee una particularidad, y es que contiene una secuencia correspondiente a un código de barras y un adaptador interno, que será necesario para secuenciar el código de barras, del cual se secuencian 5 pb para poder identificar cada una de las muestras. A continuación, se realizan dos procesos de purificación. El proceso de purificación de poli-A que contiene moléculas de ARNm utilizando perlas magnéticas (AMPure XP) que tienen unidos oligo-dT. En la segunda elución del poliA ARN, el ARN también está fragmentado y cebado para la síntesis de ADNc.

Preparación de genotecas para la amplificación y secuenciación de clúster.

Para la preparación de la muestra, las genotecas se cuantificaron utilizando PicoGreen. Basado en esta cuantificación, las genotecas fueron normalizadas a igual concentración y volumen. La genoteca fue cuantificada utilizando el ensayo de PCR en tiempo real Sybr PCR (qPCR), con los cebadores de PCR complementarios a los extremos de los adaptadores. Después de la cuantificación, las genotecas se normalizaron a 2 nM, se desnaturalizaron usando 0,2 N NaOH, y se diluyeron a 20 pM.

Población de Estudio

En este estudio se incluyeron un total de 220 casos de pacientes diagnosticados con cáncer pediátrico que fueron atendidos por el servicio de oncología pediátrica del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” y el “Centro Médico Nacional, 20 de Noviembre”, como ya se mencionó con previo consentimiento informado de los padres o tutores y asentimiento de los pacientes que participaron. Este estudio fue autorizado por los comités de bioética de las instituciones participantes. El diagnóstico de los pacientes fue confirmado por el servicio de patología.

De las todas las muestras obtenidas de los pacientes participantes para el estudio el 95.5% fueron tratados en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” y sólo el 4.5% fueron tratados en el Hospital 20 de noviembre, como se observa en la Tabla 3. Dentro del estudio se observó predominio del sexo masculino (figura 1). Dentro de los 220 pacientes se encontró que los grupos de edades más frecuente en el grupo de estudio fue el de 5-8 años de edad con una frecuencia de 27.7% seguido del grupo de 1-4 años con un 26%, finalmente la menor frecuencia fue en los menores de un año de edad con 4.5%. La región que presentó mayor número de casos fue centro sur (figura 2 y tabla 3).

SEXO

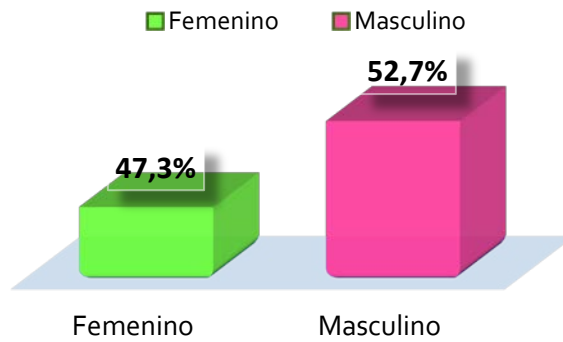


Figura 1. Distribución de casos por sexo. El 52.7% son hombre y el 47.3% son mujeres.

RANGO DE EDADES

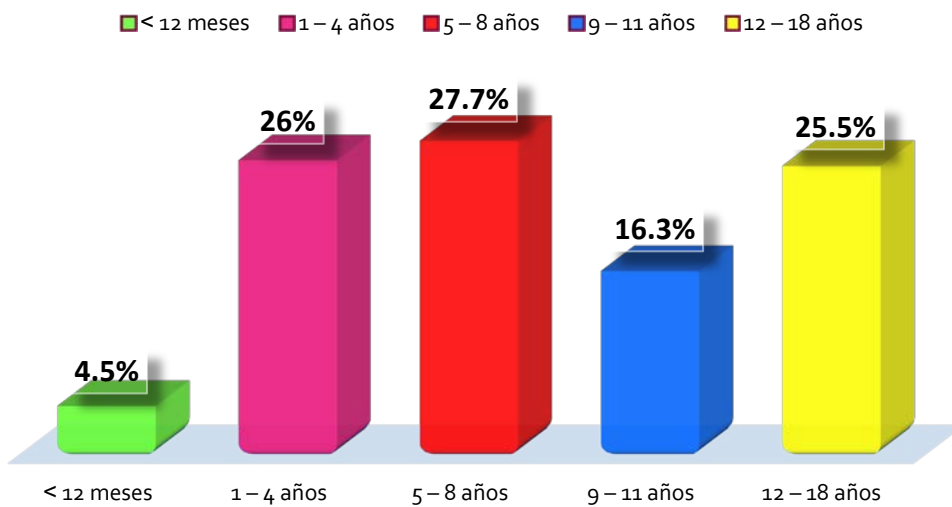


Figura 2. Distribución de casos por grupo de edad. El 27.7 fueron de 5-8 años, el 26% de 1-4 años, el 25.5% de 12-18 años, el 16.3% de 9-11 años y el 4.5% de 12 meses.

Tabla 3. Características sociodemográficas.

Edad	Frecuencia	%
<i>(X ± DE)</i>	115.5	
Rango	1 - 220	
<i>12 meses</i>	10	4.5
<i>1 – 4 años</i>	57	26
<i>5 – 8 años</i>	61	27.7
<i>9 – 11 años</i>	36	16.3
<i>12 – 18 años</i>	56	25.5
Sexo		
<i>Femenino</i>	104	47.3
<i>Masculino</i>	116	52.7
Institución		
• <i>Hospital Infantil de México</i>	210	95.5
• <i>CMN 20 de Noviembre</i>	10	4.5
Lugar de Origen		
<i>Región Noroeste</i>	6	2.6%
<i>Región Noreste</i>	3	1.3%
<i>Región Oeste</i>	10	4.3%
<i>Región Este</i>	33	14.3%
<i>Región Centro norte</i>	17	7.3%
<i>Región Centro sur</i>	146	63.3%
<i>Región Suroeste</i>	15	6.5%
<i>Región Sureste</i>	1	0.4%

El rango de edades fue de 12 meses a 18 años de edad, en mujeres y hombres. Los datos fueron extraídos de 220 niños con cáncer pediátrico del Hospital Infantil de México Federico Gómez y del Hospital 20 de Noviembre. Se tomaron en cuenta niños de diferentes estados de la República Mexicana.

En cuanto al diagnóstico histopatológico de los pacientes, el tipo predominante de acuerdo a la frecuencia, correspondió a Leucemias y enfermedades mieloproliferativas con 39.1%, seguida de tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) 29.9%, y con el menor porcentaje encontramos el neuroblastoma con el 1.8%, pero lo importante de estos datos es que nuestra paciente según el tumor que presentó se encuentra en tumores germinales, y podemos observar en la tabla 4 y figura 3 que solo 10 niños de un total de 220 presentaron

tumores germinales dando un porcentaje de 4.6, solo la niña presentó fibrosarcoma de ovario.

Tabla 4. Distribución de casos por diagnóstico histopatológico.

	Frecuencia
<i>Leucemias y Enf. Mieloproliferativas</i>	86
<i>Tumores de sistema nervioso central</i>	46
<i>Tumores hepáticos</i>	22
<i>Sarcomas de tejidos blandos y extraóseos</i>	16
<i>Tumores germinales, trofoblasticos y otros gonadales</i>	10
<i>Tumores óseos malignos</i>	10
<i>Tumores epiteliales malignos y melanomas</i>	8
<i>Linfomas y neoplasias reticuloendoteliales</i>	8
<i>Tumores renales</i>	8
<i>Otras neoplasias y neoplasias malignas no especificadas</i>	2
<i>Neuroblastoma</i>	4
<i>Total</i>	220

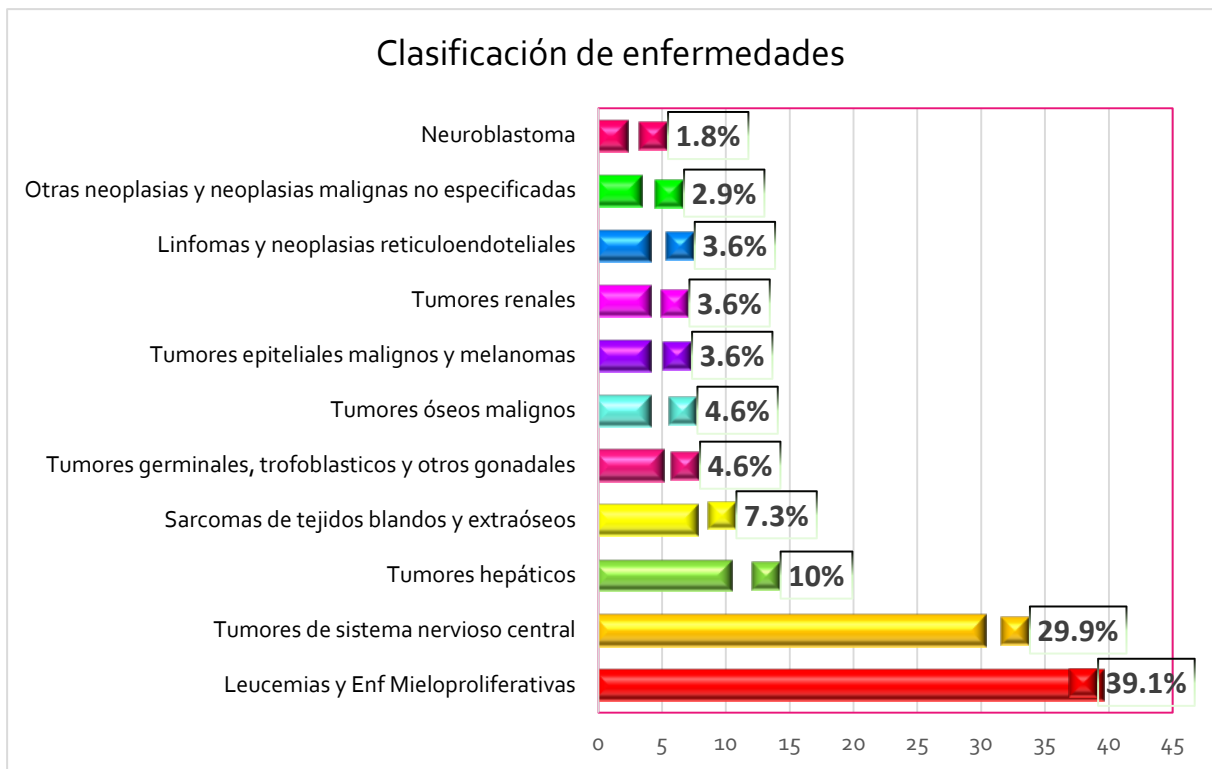


Figura 3. Distribución de casos por diagnóstico histopatológico. Con el fin de investigar el predominio de cáncer de edad pediátrica en nuestro estudio se realizó una clasificación y la mayor prevalencia de cáncer en este estudio y en otros fue Leucemia.

Se realizó una segunda clasificación de los tipos de cáncer, que presentó cada uno de los pacientes, los cuales se agruparon de acuerdo a su grupo siendo hematológico o sólido, se observó claramente que la mayor frecuencia la presentó en su conjunto los tumores sólidos como se muestra en la figura 4. La importancia de realizar esta clasificación es destacar que los tumores sólidos, en comparación con neoplasias hematológicas muestran un número de características peculiares diferentes. Entre los más relevantes, es la urgencia de iniciar la terapia anticancerosa, en las neoplasias hematológicas de alto grado como leucemia aguda y linfomas agresivos (Torres & Soares, 2015).

TIPO DE TUMOR

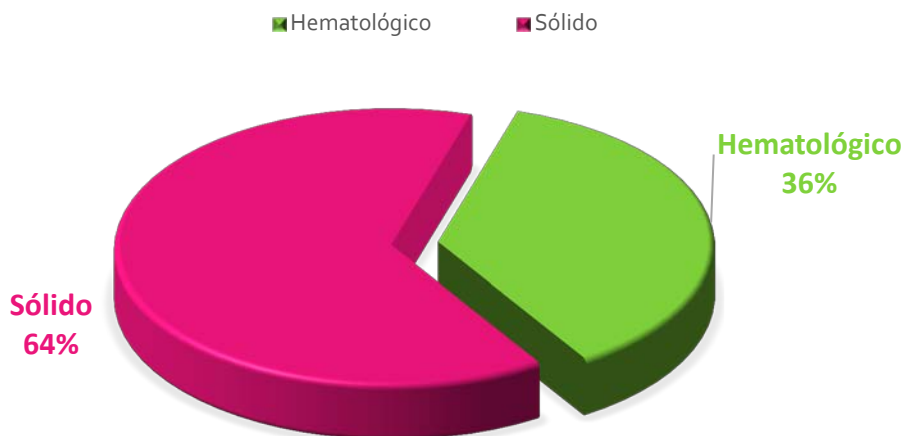


Figura 4. Distribución de casos por tipo de tumor. Los diferentes tipos de cáncer que se presentaron se clasificaron en sólidos con 64% y hematológico con un 36% del total de los pacientes.

Antecedentes Familiares de Cáncer

Narod y cols. reportaron que aproximadamente el 10% de los pacientes pediátricos con cáncer tiene predisposición genética (Narod, Stiller, & Lenoir, 1991). Sin embargo, algunos autores han propuesto que es mayor el porcentaje y que un gran número de variantes genéticas no han sido identificadas hasta el momento. Para evaluar la frecuencia de casos con probable predisposición genética en nuestra población, utilizamos un cuestionario reportado por Jongmans y cols (Jongmans et al., 2016). Los cuales desarrollaron esta herramienta en base a una revisión de la literatura y como resultado consideraron 5 características que son: 1. Historia familiar, 2. Tipos de tumores específicos, 3. Múltiples tumores primarios, 4. Características especiales y 5. Toxicidad severa (Ver Anexo No. 1). Si una o más de estas características son positivas se recomienda que el paciente y la familia sean evaluados por un genetista.

En la tabla y figura 5 podemos observar la frecuencia de la historia familiar de los pacientes del estudio, el 42.3% de los pacientes refirió tener uno o varios familiares con antecedentes de cáncer. Más de la mitad de los pacientes (57.7%) refirieron no tener ningún familiar con cáncer, pero aquí debemos agregar que algunos desconocían la causa de muerte de sus familiares como abuelos y otros familiares por diversas circunstancias, en especial la familia de la pacientes desconocía sus antecedentes familiares, solo tenían información de que la tía y prima habían tenido cáncer de ovario.

Tabla 5. Frecuencia de Antecedentes de Cáncer en la Familia.

<i>Historia Familiar</i>	<i>Frecuencia</i>
Si	93
No	127
Total	220

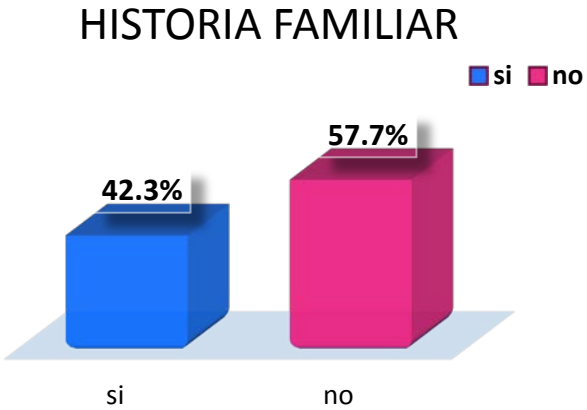


Figura 5. Historia Familiar. Se considera que un paciente tiene una historia familiar de la enfermedad si por lo menos un familiar ha sido diagnosticado con cáncer.

Tabla 6. Indicadores de predisposición genética

Indicadores de predisposición genética			
Variable	No. Niños		%
Historia Familiar (< 45 años)	59		26.8
<ul style="list-style-type: none"> • Osteosarcoma • Síndrome de Hodking • Cáncer de tiroides • LLA • Cáncer gástrico • Cáncer de mama • Cáncer de páncreas • Cáncer cervicouterino • Cáncer de huesos • Cáncer de hígado • Tumor de Wilms • Tumor de ovario • Cáncer cerebral • No especifican 			
Tipos de tumores específicos.			
Diagnósticos de los niños de la lista del cuestionario	63		28.6
<ul style="list-style-type: none"> • Tumor teratoide rabdoide atípico • Hepatoblastoma • JMML • LLA Hipodiploide • Tumor maligno de la vaina del nervio periférico • Carcinoma medular de tiroides • Medublastoma • Glioma óptico • Shwannoma (neurilemoma) • Tumor de células gigantes subependimales 			
Múltiples tumores primarios	0	0	
Características especiales	13		5.9
<ul style="list-style-type: none"> • Anomalías congénitas <ol style="list-style-type: none"> 1. Síndrome de Down 	9		

• Trastornos hematológicos	4	
2. Anemia		
Toxicidad severa	50	22.7
(criterios para toxicidad severa)		
1. Internamiento prolongado (< 15 días)	4	
2. Suspensión de tratamiento	5	
3. Choque séptico	39	
4. Internamiento en terapia intensiva	2	

Los indicadores se tomaron del cuestionario propuesto por Marjolijn y Jongmans. El primer indicador es la historia familiar, se tomó en cuenta aquellos pacientes que tenían familiares con cáncer antes de los 45 años de edad, asimismo se coloca el tipo de cáncer que presentó cada uno de los familiares. El segundo indicador, muestra cuantos niños presentaron un tumor específico de la lista del cuestionario que se anexo. El tercer indicador, fue para conocer cuántos niños tuvieron dos tumores en el mismo sitio al mismo tiempo. El cuarto indicador, nos indica cuantos niños tuvieron alguna anomalía genética de nacimiento. El quinto indicador, fue para conocer si al recibir quimioterapia tuvieron toxicidad severa. Estos indicadores nos dan una predisposición al cáncer que padecieron los niños.

INDICADORES DE PREDISPOSICIÓN GENÉTICA

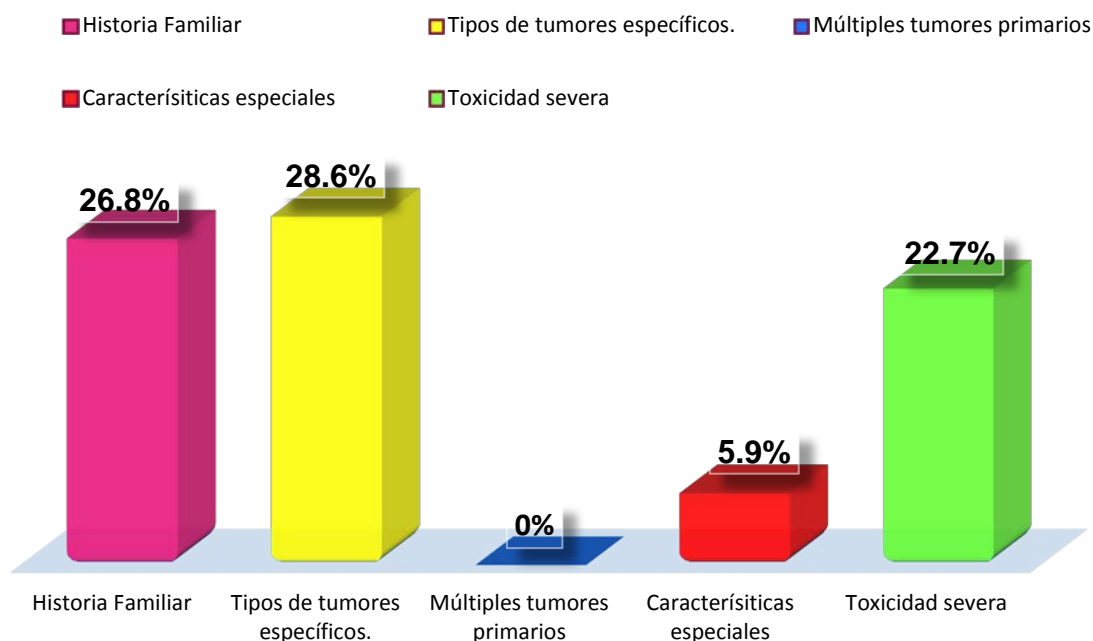


Figura 6. Historia Familiar. Porcentaje de los resultados del cuestionario de predisposición genética.

Los resultados obtenidos conforme al cuestionario aplicado de Marjolijn y Jongmans (Jongmans et al., 2016). Muestran que el 26.36% refirió tener un familiar con cáncer antes

de los 45 años de edad de los cuales 22 de estos familiares presentó LLA y 10 cáncer de mama, sin embargo, algunos no conocían el tipo de cáncer que habían padecido sus familiares. En tipo de tumores específicos hubo un 20.6% de los niños, de los cuales 21 presentaron Hepatoblastoma, 13 JMML (Leucemia Juvenil Mielocítica) y 12 de estos niños presentaron Meduloblastoma. En características especiales, encontramos que 5.9% de los casos presentó una anomalía congénita, Síndrome de Down y trastornos hematológicos, es decir que 4 de estos pacientes antes de ser diagnosticados se presentaron en el médico por anemia. En seguida podemos observar que el 22.7% presentó toxicidad severa, en alguna literatura los criterios que se toman como toxicidad severa son algunos síntomas que la mayoría de los pacientes presentó después de recibir quimioterapias y son náuseas, neutropenia, trombocitopenia, etc. sin embargo los criterios que se tomaron en cuenta para este estudio fueron: internamiento prolongado (> 15 días), suspensión de tratamiento, choque séptico e internamiento en terapia intensiva (Ferreiro, 2003).

Tabla 7. Número de criterios positivos en casos.

Criterios	No. De niños	%
1	90	40.9
2	35	15.9
3	6	2.72
4	1	0.45
5	0	0
Total	132	60%

Los criterios que se tomaron en cuentas fueron de las preguntas del cuestionario antes mencionado, y se hizo una clasificación de acuerdo al número de preguntas que resultaron positivas en los niños. El cuestionario plantea que se necesita de un solo criterio para la predisposición genética.

Dentro de los resultados de las variables de la predisposición genética, se encontró que 40.9% de los niños fueron positivos para un criterio, 15.9% presentaron dos criterios, 2.72% tuvieron tres criterios y sólo un caso presentó 4 de los 5 criterios, mientras que ningún niño presentó 5. Sin embargo algunos refirieron no tener contacto con algunos de los familiares ya que son, madres solteras, padres solteros o los tíos o abuelos se hacen cargo de los niños por que los padres fallecieron o los abandonaron. Con estos resultados se predice que en 132 niños su enfermedad pudo ser hereditaria. La niña sólo presentó 1 criterio del cuestionario y fue la historia familiar.

Del total de los casos sólo se realizó secuenciación de exoma de 18 pacientes, de los cuales se seleccionó el caso de una paciente como prueba de concepto para el desarrollo del presente proyecto por la rareza de la enfermedad y los antecedentes familiares.

PRESENTACIÓN DEL CASO

Se presenta el caso de una paciente de 7 años de edad previamente sana, originaria de Xilotzingo, Estado de México. Habita con sus padres y hermanos en casa rentada con servicios básicos de urbanización, la niña es producto de la tercera gestación, nació por vía vaginal a las 32 semanas de gestación por hematoma uterino, los controles prenatales fueron normales, pero permaneció hospitalizada durante tres días y fue alimentada con seno materno hasta los 2 meses. Ambos padres aparentemente sanos sin antecedentes de importancia. Hermana de 14 años sana, hermano de 13 años con antecedentes de tumor de Wilms bilateral.

Se presentó en el hospital con un cuadro de 1 mes de evolución por dolor abdominal en hipogastrio y mesogástrico generalizado que se irradia a piernas de una semana de evolución disuria de un mes de evolución, pérdida de peso de 4 kg en un mes, palidez de tres semanas de evolución. Se realizó un estudio de TAC abdominal que reporta una masa de consistencia heterogénea (figura 7) con componente líquido y sólido, de bordes regulares de 17 X 9.5 cm a expensas de anexo derecho, vejiga y recto desplazados, comprimidos, datos de hidronefrosis secundaria.

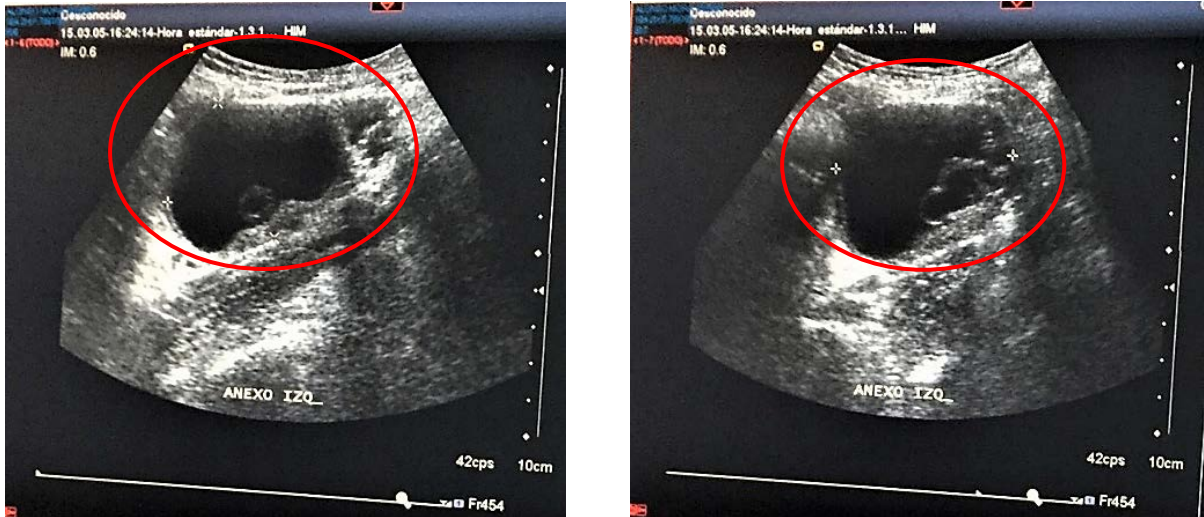


Figura 7. Ultrasonido del tumor de la paciente. Se observa una masa de gran tamaño en el ovario de lado derecho, imágenes obtenidas del Hospital Infantil Federico Gómez.

Después de realizar estudios imagenológicos, se decide intervenir quirúrgicamente. Se realizó una salpingooforectomía, omentectomía y apendicectomía. Los hallazgos quirúrgicos encontrados fueron tumor de ovario derecho roto con hemoperitoneo adherido a sigmoides, que al disecar es causa de perforación puntiforme y desperitonización sigmoides, se empaquetó por sangrado de lecho quirúrgico. Dos días después realiza desempaqueamiento y aseo de cavidad, donde se encontró lecho quirúrgico con mínimo sangrado. La paciente fue tratada con quimioterapia adyuvante a base de 6 ciclos de CISCA II (adriamicina, ciclofosfamida y cisplatino). Inicia vigilancia en junio del 2012.

Se presentó periódicamente a sus citas, en el 2014 nuevamente presentó un quiste en el ovario izquierdo el cual aumentó de volumen en abril del 2015, se programó para laparoscopia, sin embargo, se notó contenido gelatinoso y se realizó salpingootorectomía izquierda. El diagnóstico del quiste fue tumor de células de la granulosa juvenil.

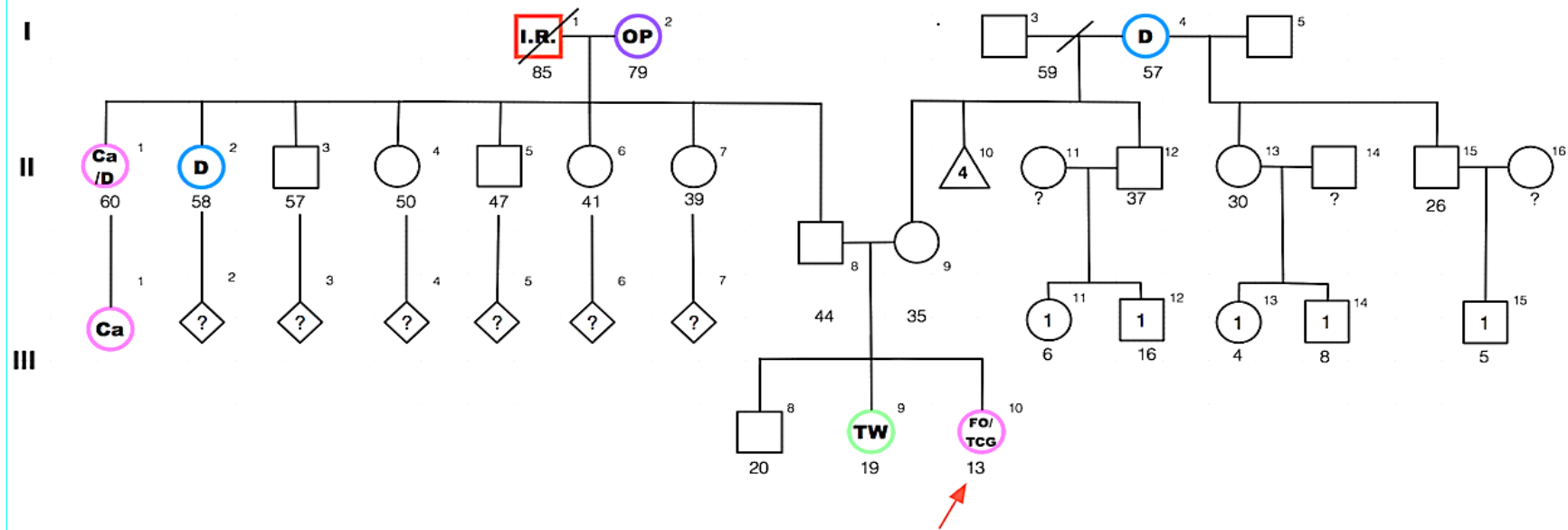
Árbol Familiar.

Los antecedentes familiares representan una poderosa herramienta de detección y por lo general, se consideran una "prueba genética" que puede ayudar a diagnosticar algunas enfermedades, en base a esto se debería de hacer conciencia en los pacientes lo importantes que son para su salud. Estos antecedentes contribuyen a las decisiones sobre las pruebas genéticas a las que se debe someter un paciente y todos los miembros de la familia que se encuentren en riesgo (Screening, 2009) .

La identificación oportuna de un mayor riesgo de enfermedad le permite al paciente y al profesional de la salud tomar medidas para reducir el riesgo. Sería importante la implementación de programas que inviten a las familias a crear su árbol genealógico y contestar cuestionarios de predisposición genética, lo que podría generar cambios en el estilo de vida, la realización de intervenciones médicas oportunas o el aumento del monitoreo de la enfermedad.

En primera instancia realizamos el árbol genealógico de la familia en OmniGraffle 7.3, con el objetivo de observar si existía algún patrón de herencia reconocible. En los antecedentes de la niña se encontró que su hermano fue diagnosticado con tumor de Wilms y su tía y prima con cáncer de ovario, esto se observa en la figura 8 marcado con círculos rosas y verde, es importante destacar que la familia negó otros antecedentes.

Árbol Familiar



- I, 1: **IR**. Causa de muerte Insuficiencia renal. Edad desconocida del diagnóstico.
 I, 2: **OP**. Osteoporosis y operación en la rodilla. Edad desconocida del diagnóstico.
 I, 4: **D**. Diabetes mellitus tipo 2. Edad desconocida del diagnóstico.
 II, 10: Cuatro tíos muertos antes de nacer, se desconoce meses de gestación.
 II, 1: **Ca/D**. Cáncer de ovario y diabetes mellitus tipo 2. Edad desconocida de diagnóstico.
 III, 9: **TW**. Hermano con tumor de Wilms y actualmente con hemodiálisis. Diagnóstico a los 5 años de edad.
 III, 10: **FO/TCG**. Fibrosarcoma de ovario. Edad de diagnóstico a los 7 años de edad. Tumor de las células de la granulosa juvenil. Edad de diagnóstico a los 11 años.
Ca: Cáncer.

- IR**: Insuficiencia renal.
D: Diabetes.
OP: Osteoporosis.
TW: tumor de Wilms.
F.O: fibrosarcoma de ovario.
TCG: Tumor de las células de la granulosa juvenil.
4: pérdida de embarazos.

Figura 8. Árbol Familiar. Los cuadrados representan el sexo masculino, los círculos el sexo femenino, el triángulo representa pérdida de embarazos antes del nacimiento, los rombos simbolizan que se desconocen el número y sexo de los hijos. El color rosa representa cáncer en ovario, el color azul enfermedad crónica en este caso diabetes, el color rojo muerte y el color verde el tumor de Wilms. La flecha roja señala el lugar que ocupa la paciente. Debajo del árbol genealógico se describen las siglas y la descripción de cada uno de los que están marcados en el mapa. Elaboración propia

Criterios histopatológicos para el diagnóstico de fibrosarcoma de ovario

El fibrosarcoma de ovario es difícil de diagnosticar y suele evaluarse por sus patrones de crecimiento, atipia celular y su tasa mitótica. Se trata de un tumor amarillo grisáceo o blanco grisáceo y cuya consistencia varia de firme y elástica a blanda y friable, es un tumor de origen celular mesenquimal, produce abundante colágeno y se compone de fibroblastos malignos. Los fibrosarcomas pertenecen a la familia de los tumores fusocelulares, la clasificación histológica de los tumores de tejidos blandos es importante debido a que permite establecer su pronóstico. Los aspectos más importantes que se consideran en la clasificación, son la morfología celular y el patrón de crecimiento del tumor (Lee & Ahmed, 2003).

En el fibrosarcoma se observan las siguientes características (PRAT & SCULLY, 1982):

- Microscópicamente: Masa fibrosa, blanca grisácea, brillante, firme y elástica, no muy vascularizada presentando, a veces, hemorragias necrosis. Por lo general, de forma ovoide, con bordes irregulares.

Debido a que es una lesión altamente variable, se ha dividido en 2 tipos (Lee & Ahmed, 2003; Zong, Lin, & Fan, 2014):

- a) Bien diferenciados: Con células fibroblásticas fusiformes y elongadas, dispuestas en fascículos entrecruzados, con considerable sustancia intercelular colágena. Los núcleos son ovoides, hipercromáticos, sin atipia celular ni actividad mitótica evidente. Crecen lentamente y están bien delimitados.

- b) Pobrementemente diferenciado: Se caracteriza por ser muy celular, presentando estroma conectivo.

Sin embargo, en algunas áreas se puede encontrar abundantes fibras colágenas, a menudo

hialinizadas. Los núcleos muestran marcada atipia celular, y son hipercromáticos, bizarros o múltiples, con evidente actividad mitótica. Presentan un crecimiento rápido.

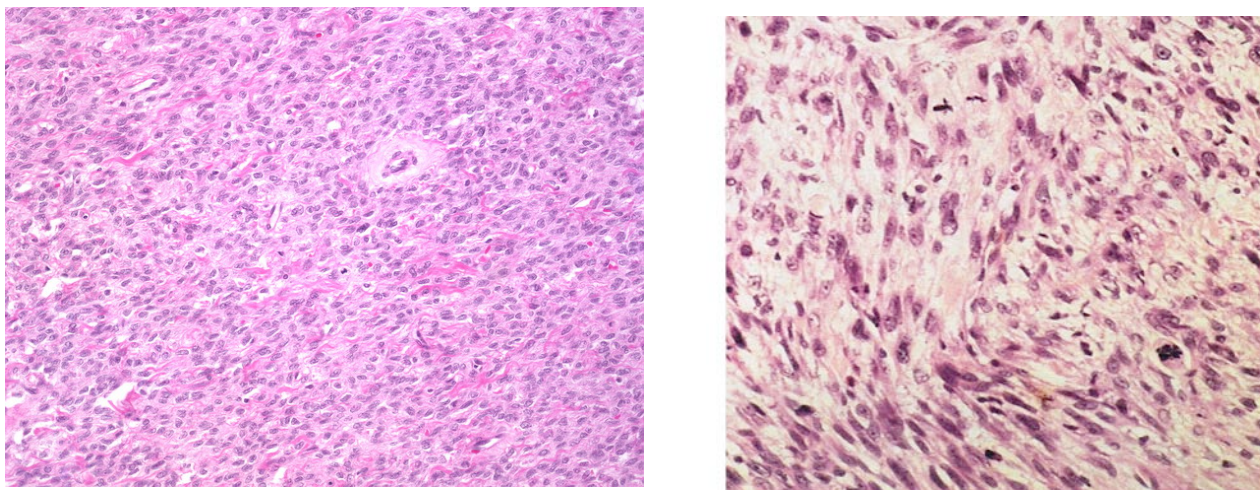


Figura 9. Histopatología de Fibrosarcoma. A. fibrosarcoma de ovario, se observan células fusiformes y actividad mitótica. B. Fibrosarcoma: es una atipia citología moderada con figuras mitóticas, incluyendo formas atípicas, que se originan en el tejido conectivo mensequimático.

Fuente: <http://www.suggest-keywords.com/Zmlicm9zYXJjb21hIHhhdGhvbG9neQ/>

El tumor de ovario derecho (800 gr) de 19 x 13 x 3 cm, fue enviado al servicio de patología del Hospital Infantil Federico Gómez, también fue revisado el INMEGEN y Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga, se reportó lo siguiente:

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:

Los cortes histopatológicos realizados por los patólogos mostraron lesión neoplásica constituida por células fusiformes (alargadas) dispuestas en fascículos cortos que se entrecruzaban figura 9A. El citoplasma era claro y el núcleo redondo de cromatina fina granular. Había áreas con aspecto mixoide en donde las células tenían una forma estrellada. Se observó necrosis y hemorragia extensa. Tenía otras áreas con cartílago maduro que formaban nódulos. Se identificaron en algunos cortes fragmentos de pared intestinal con capa muscular propia en contacto con la lesión neoplásica.

- Se observó tuba uterina con epitelio sin alteraciones histológicas. Adyacente a la tuba había tejido ovárico con edema difuso y un quiste folicular.
- Los cortes mostraron apéndice cecal con hiperplasia del tejido linfoide con centros germinales grandes.
- Se observó tejido adiposo maduro con vasos congestivos.

Después de recibir el reporte del Hospital Infantil de México Federico Gómez antes mencionado, se mandó un pequeño fragmento de la muestra a Patología del INMEGEN y se revisó junto con Patólogos del Hospital General de México los resultados que obtuvieron fueron los siguientes:

No se encontró mitosis, sólo tenía muchas figuras apoptóticas y núcleos "aplastados". Realizaron otro corte y ya no aparecía la zona de mayor densidad celular. Sin embargo, el hecho de que no estuvieran en ese corte no indicaba que el caso no tenga mitosis, el fragmento que se observó era pequeño por tal razón era difícil determinar lo que se veía. El reporte de patología del Hospital Infantil, no reporta el número de mitosis solo la IHQ (Análisis de inmunohistoquímica) . Pero se llegó a la conclusión que si se trataba de un sarcoma con patrón fusocelular, características que tienen que ver con fibrosarcoma de ovario.

Con base a los reportes de patología de la literatura si se cumplieron los criterios del diagnósticos, ya que el tumor presentó un aspecto gelatinoso (colágeno), áreas fibrosas, necrosis y hemorragias, con serosa lisa y brillante. Las siguientes imágenes muestran la histopatología del tumor. Asimismo este fue apoyado por morfología y tinción IHQ positiva para vimentina (100% de células positivas), desmina (20% de células positivas) Y EMA negativos, AML y ALK (no mostrados).

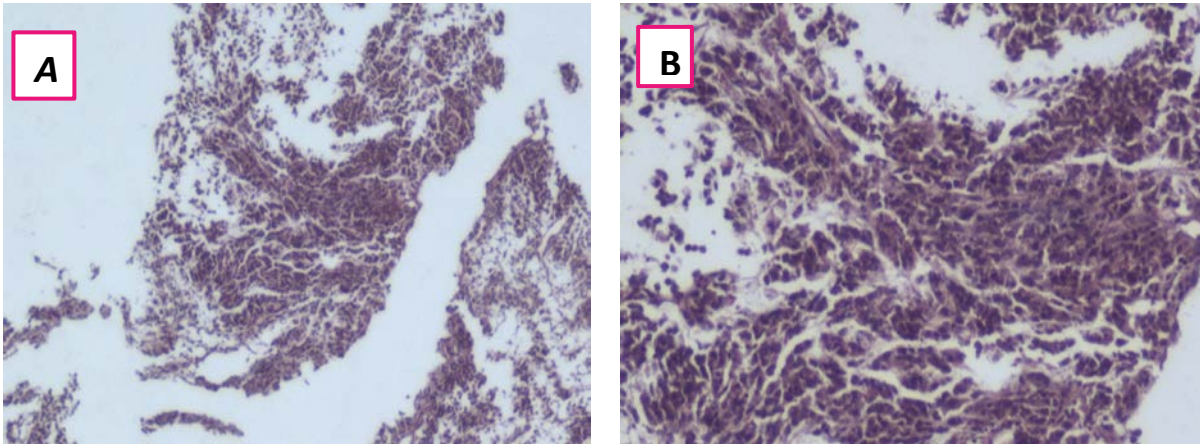


Figura 10. Histopatología de fibrosarcoma de ovario. A: 10x. B: 40x. Imagen histopatológica de la muestra obtenida del tumor de fibrosarcoma de ovario del paciente. Tinción con hematoxilina eosina en el tumor, muestra la proliferación de células fusiformes.

Criterios histopatológicos del tumor de células de la granulosa juvenil

Los tumores ováricos de células de la granulosa juvenil son neoplasias raras, y se consideran malignidades de bajo grado con un pronóstico relativamente más favorable en comparación con otros tumores. Este tipo de tumores normalmente se presenta en edad adulta y representan el 4.3% de los tumores ováricos malignos (Ayhan, Salman, Velipasaoglu, Sakinci, & Yuce, 2009).

Este tipo de tumores se derivan de células granulosas, que son células somáticas de los cordones sexuales del ovario que están estrechamente asociadas con el ovocito en desarrollo, se diferencian del epitelio celómico o de los precursores mesenquimales (Kottarathil, Antony, Nair, & Pavithran, 2013). La principal función de estas células es la producción de esteroides sexuales y diversos péptidos necesarios para la foliculogénesis y la ovulación.

La histopatología de los tumores de células de la granulosa juvenil que se han presentado en estudios anteriores son (Bus, Buzogany, Nagy, & Vajda, 2017; Kottarathil et al., 2013; Rodríguez, 2009):

- Microscópicamente: presentan un color amarillo tostado, gris-blanco, son tumores heterogéneos, sólidos y quísticos con formación de lóbulos, nidos y palisades

perivasculares de células tumorales de granulosa con escaso citoplasma, núcleos ovoides, hipercromatados y ranuras nucleares en varias zonas. Presentan por lo general más de 10 cm de tamaño, con citoplasmas eosinofílico o vacuolado moderado a abundante y el componente celular es lutenizante figura 11 A y B. También puede presentar áreas hemorrágicas y con necrosis, como se muestra en la figura 11 B.

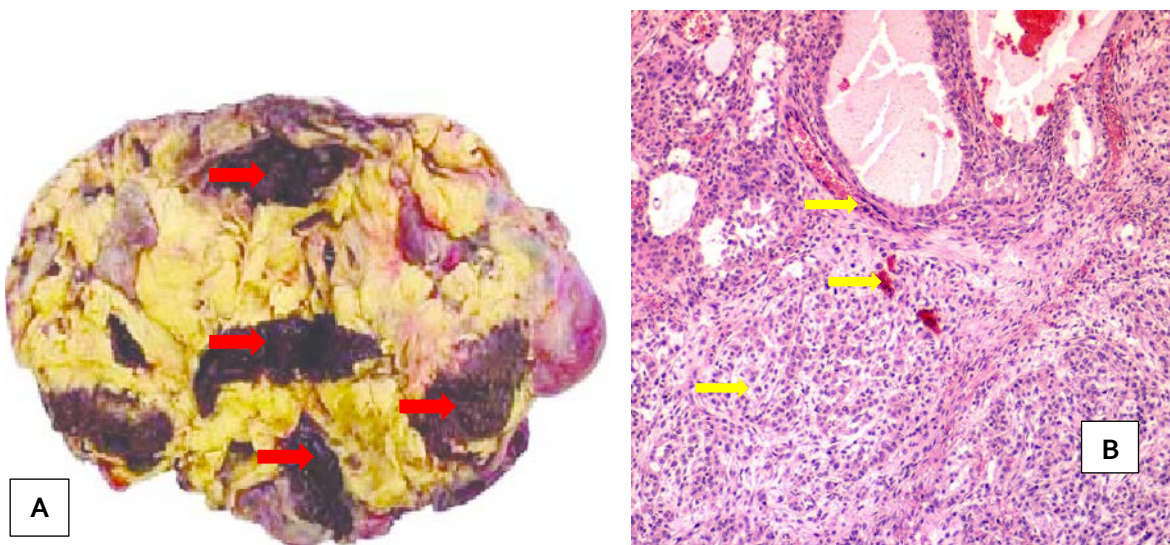


Figura 11. A. Tumor de las células de la granulosa juvenil con áreas hemorrágicas y áreas solidas de color amarillo. B. Histopatología del tumor de las células de la granulosa juvenil, con células fusiformes ovaladas y hendiduras.

Fuente: https://www.researchgate.net/figure/257944224_fig2_Figura-2-Patron-solido-de-celulas-neoplasicas-fusifor-mes-con-nucleos-ovalados-y

El segundo tumor de ovario izquierdo de 65g, de 6 X 5 X 2 cm fue enviado al servicio de patología del Hospital Infantil Federico Gómez y presentó las siguientes características:

- Con superficie externa lobulada de color gris blanquecina, no se identificó salpíngex. Al corte superficie heterogénea multinodular con áreas fibrosas y sólidas, necrosis 10%.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA

- Los cortes mostraron tejido ovárico con neoplasias difusas, constituida por cordones trabeculares y nidos sólidos compuestos por células de núcleos de mediano a gran tamaño,

de formas apiñonadas, otros irregulares, cromatina granular, algunos de ellos con hendidura nuclear, escaso citoplasma eosinófilo, bajo índice mitótico. En algunas áreas se observaron macro y microfolículos con materia eosinófila en la luz, otras áreas de pared quística, revestida por epitelio columnar ciliado entre-mezclado. Se observaron células de Leydin.

De acuerdo a los reportes de patología que se han hecho del tumor de células de la granulosa, se cumplieron los criterios reportados en el diagnóstico del tumor, ya que presentó áreas fibrosas, nidos sólidos, gris-blanco, mitosis.

Secuenciación de Exoma

Por la rareza del tumor y los antecedentes de la existencia de un hermano de la paciente con tumor de Wilms bilateral, se decidió realizar secuenciación de exoma para tratar de identificar mutaciones germinales que pudieran estar asociadas al desarrollo del fibrosarcoma de ovario de la paciente.

El exoma es el conjunto de moléculas de ADN del genoma, está formado por los exones, son las regiones codificantes que van a proporcionar la información para la síntesis de una proteína y es una de las formas de estudiar nuestro ADN. La secuenciación completa del exoma es una técnica que se ha convertido en una herramienta poderosa y común para identificar genes causantes de trastornos hereditarios. La secuenciación del exoma se dirige a las regiones codificantes de los genes. Estas regiones específicas de genes de un individuo, llamados exones, se capturan y se secuencian. Al secuenciar los exomas tenemos un máximo rendimiento en el diagnóstico, además hay una ampliación del fenotipo clínico a través de la detección de nuevas variantes o genes asociados a la patología aún no descritos (Sonia Santillán-Garzón et al., 2015).

Se tomaron muestras de tejido y sangre periférica y el ADN fue extraído de acuerdo al protocolo que se indica en la sección de métodos. Las muestras fueron cuantificadas y los resultados obtenidos son los siguientes (tabla 8). Podemos observar que la pureza de muestra es aceptable para el estudio.

Tabla 8. Resultados obtenidos de la extracción de ADN de tejido y sangre periférica de la paciente.

Muestra	Método	Fecha	Concentración (ng)	260/280	260/230
<i>Tejido</i>	Nanodrop	18/08/12	366.34	1.93	2.19
<i>Sangre periférica</i>	Nanodrop	18/08/12	1326.32	1.87	2.39

Las muestras fueron enviadas al Instituto Broad MIT/Harvard donde se realizó secuenciación de exoma de las muestras de ADN de tejido y sangre periférica. Se utilizó una genoteca basada en CCDA y RefSeq genes, con aproximadamente 18,560 genes (32,7 Mb). Las genotecas se secuenciaron utilizando lecturas de 76 pb. Se obtuvieron lecturas pareadas de $2,5 \times 10^8$ y $1,5 \times 10^8$ para el ADN germinal de sangre y tumoral como se muestra en la tabla 9. La cobertura media obtenida después de la alineación fue de 89% a 20x para el ADN de sangre y 88% a 20x para el ADN tumoral, además los resultados demuestran que la calidad de ADN fue buena, esto implica un estudio muy completo de las secuencias codificantes analizadas con elevada capacidad de diagnóstico en la gran mayoría de las regiones. La secuenciación se realizó con la plataforma Illumina HiSeq 2000 con los kits de secuenciación V3 y pipeline Illumina 1.3.4 (Illumina, CA).

Tabla 9. Resultados de Cobertura y Calidad de Secuenciación de Exoma

Muestra	Tejido	Sangre
Cobertura	88%	89%
PF HQ A ligned Q20 Bases	10.186.922.401	13.857.952.558
PF Readers Aligned	140.938.664	190.930.057
Total Reads	186.611.810	253.775.472
Mean Read Lenght	76	76
Coverage Goal	76%	76%

PF (pass filter), lecturas que pasaron el filtro de illumina chastity. **PF HQ Aligned Q20 Bases**, número de bases alineadas a la secuencia de referencia en lecturas que mapearon con alta calidad y el score de calidad fue Q20 o mayor). **PF Reads Aligned**, número de lecturas PF que alinearon a la secuencia de referencia. **Total Reads**, número de total de lecturas que incluyen las PF y No PF. **Mean Read length**, promedio de longitud del grupo de lecturas examinadas.

Secuenciación de ARN

La secuenciación del ARN de la muestra de tumor primario fué realizada con el propósito de validar los resultados reportados por el análisis de secuenciación del ADN de las muestras pareadas de la paciente.

La importancia de secuenciar ARN, es porque los niveles de ARN pueden dar no solo una visión clara de patrones de expresión, sino también cuantificaciones altamente correlacionadas entre cambios en la abundancia de ARNm con cambios en la abundancia de proteínas (Soto Sedano & Lopez Carrascal, 2012). Además, la secuencia de ARN tiene la ventaja de que permite identificar translocaciones, lo cual es de particular interés en el cáncer pediátrico ya que cerca del 30% de los tumores tiene translocaciones características. El RNAseq también permite la cuantificación de ARN largos no-codificantes y el análisis del empalme de isoformas de ARN. Además, la secuencia de ARN da una cobertura completa de transcritos, isoformas de empalme, así mismo, genera información no solo de la secuencia, sino también de la estructura de exones y posibles eventos

de una edición alternativa (Gulledge, Roberts, Vora, Patel, & Loraine, 2012; Lister, Gregory, & Ecker, 2009).

Extracción ARN

Se tomó una porción del tumor de la paciente para la extracción de ARN (30 gr) utilizando el kit AllPrep DNA/RNA Mini Kit Qiagen, cat. 80204, la muestra fue homogenizada en Buffer RLT con β -mercaptoetanol, el lisado obtenido se centrifugó durante todo el proceso a una velocidad de $\geq 8000 \times g$ (≥ 10000 rpm), se colocó en un nuevo tubo, en el cual se le añadieron 600 μ l de etanol al 70%, posteriormente se colocó la columna en un nuevo tubo de 2 ml y se transfirió 700 μ l de la muestra en la columna, se centrifugó, y se desechó el sobrante y se añadieron 700 μ l Buffer RW1 y se centrifuga 15s. Nuevamente se desechó el sobrante y se añadieron 500 μ l de Buffer RPE a la columna RNeasy spin y se centrifugó durante 15s. El sobrante se desechó y se añadieron 500 μ l de Buffer RPE a la columna se centrifuga por 2 min. Se colocó la columna en un nuevo tubo de 1.5 ml, se añaden 30-50 μ l Agua libre de RNAsas según el peso del tejido y se centrifugó por 1 min, para la elución del ARN, (ver completo en anexo).

Se evaluó que la pureza y concentraciones fueran las adecuadas para el procedimiento. La Concentración del ARN de 260/280 osciló entre 2.06 y 2.07, la cual debe tener un valor superior a 1.8, asumiendo que cuando el valor es igual a 2.0 el estrato es puro, así mismo la pureza del ARN de 260/230 fue de 2.16 y 2.18 (tabla 10), asumiendo que el intervalo es de 2.0-2.2, por tanto, la pureza de la muestra fue buena.

Tabla 10. Pureza y concentraciones de RNA.

Muestra	Fecha	ng/μl	A260	A280	260/280	260/230
<i>RNA0090</i>	27/05/2014	232.79	5.82	2.83	2.06	2.16
<i>RNA0090</i>	27/05/2014	231.44	5.786	2.802	2.07	2.18

Se observó que la muestra tuvo un RIN (RNA INTEGRITY NUMBER) de 9.3 lo que quiere decir que la calidad de la muestra era adecuada, estos resultados permitieron que la muestra se secuenciara para la investigación realizada.

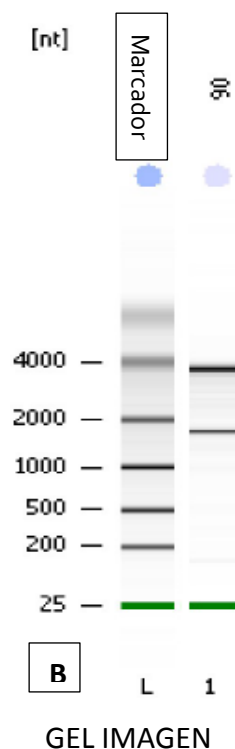
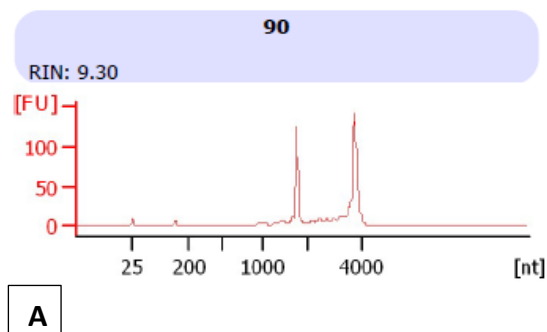
Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes:

Resultados de la Integridad del ARN (Bioanalyzer 2100)

RIN (RNA INTEGRITY NUMBER)

Tabla 11. Integridad del ARN (RIN).

#	Código de muestra	RIN	OBSERVACIONES
1	522040110090	9,3	



ELECTROFEROGRAMAS DE BIOANALIZADOR

GEL IMAGEN

Figura 12. La calidad del ARN. Se verificó usando un bioanizador (2100 Expert [B.02.08.SI648]) y se obtuvo un RIN de 9.3 (A y B). **A.** Distribución de longitudes de la muestra de ARN de fibrosarcoma de ovario antes de que los adaptadores fueran ligados. **B.** El adaptador de ARN ligados se ejecutó en un gel para ARN pequeños.

Mutaciones Somáticas

Las células llevan a cabo procesos estructurales y funcionales, conocidos en conjunto como ciclo celular, este incluye una serie de pasos que conducen a la división celular para el funcionamiento del organismo. El cáncer es resultado de uno o más trastornos en ese ciclo celular, la mayoría ocurre en las células somáticas y muchos de los cánceres pueden ser genéticos y no heredables. Las mutaciones somáticas se pueden presentar en cualquiera de las células del cuerpo y es probable que muchas de ellas sean una consecuencia de defectos en la reparación y mantenimiento del ADN (Forbes et al.).

Tasa de mutación

La tasa de mutación es el número de mutaciones que pueden darse en un gen o en una secuencia de ADN. Una alta tasa de mutación aumenta el número de mutaciones perjudiciales. Cada especie tiene una tasa de mutación propia que ha sido modulada por la selección natural para que la especie pueda enfrentarse a su medio ambiente (Barbadilla). Las tasas de mutación estimadas, se sitúan en torno a 1×10^{-9} sustituciones por nucleótido por división en células somáticas, y $1,3 \times 10^{-8}$ sustituciones por nucleótido por generación en la línea germinal (Genetica, 2011). En este estudio encontramos que la paciente presentó una baja tasa de mutación del 0.77/Mb; revisando la literatura se encontró que esto pasa en varios cánceres pediátricos, sin embargo, las mutaciones que se encontraron en los genes son altamente perjudiciales como se muestra en la tabla 10, tras la evaluación de la CADD (Combined Annotation-Dependent Depletion).

Las regiones codificantes que se encontraron en los genes, fueron 16 como se muestra en la tabla 12, estas regiones codifican para una proteína, y son mutaciones génicas, es decir que la mutación se está dando dentro del gen; en la figura 13 podemos observar las regiones y los genes importantes de acuerdo a su localización genómica, asimismo la ubicación de las mutaciones

génicas. El reordenamiento de los cromosomas se observa en el círculo de adentro y en el centro del círculo podemos observar donde se encuentra cada una de estas mutaciones somáticas.

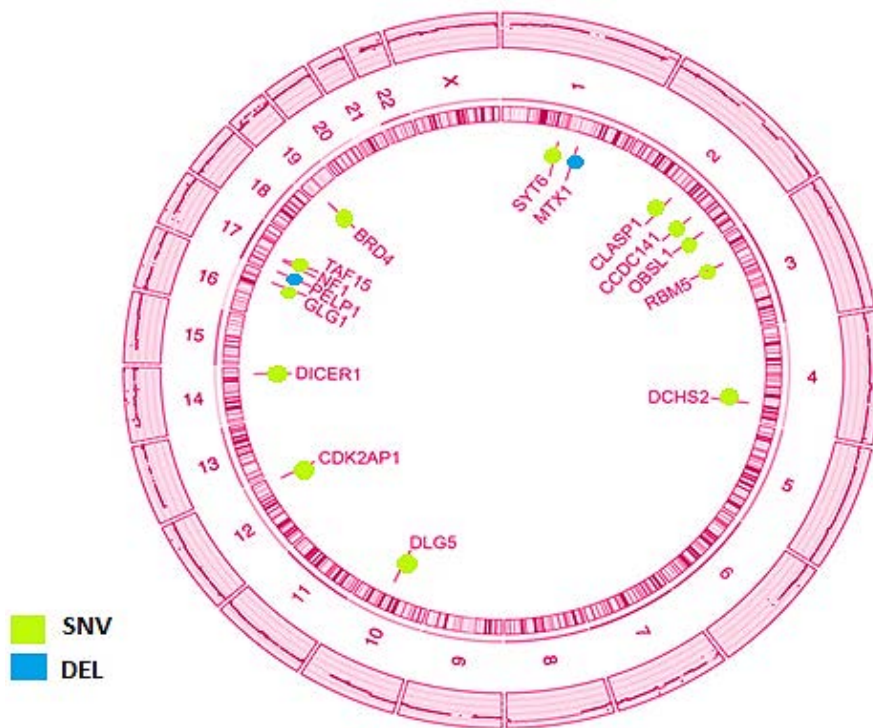


Figura 13. Alteraciones genéticas encontradas en el fibrosarcoma de ovario. La cobertura de secuenciación de exoma del tumor primario se utilizó para enumerar los reordenamientos cromosómicos. Los cromosomas 1-22 y X están ordenados en el círculo interior el cual muestra mutaciones somáticas, amplificaciones de SNV y deleciones en el tumor. Las regiones y los genes importantes se etiquetan de acuerdo a sus localizaciones genómicas.

La mayoría de las mutaciones génicas presentes en la muestra fueron de cambio de sentido de un solo nucleótido, también se encontraron mutaciones, de cambio de marco, sin sentido, deleciones e inserciones, como se observa en la tabla 12; para validar los resultados se empleó RNASeq de las muestras tumorales, la cual es una herramienta transcriptómica actual que está fundamentada en la secuenciación de ADNc, se captura el ARN total o ARNm, el cual se fragmenta y convierte en una genoteca de ADNc. Uno de los pasos fundamentales es la obtención de un ARN de buena calidad que represente todos los transcritos que se producen en el tejido de estudio (Soto Sedano & Lopez Carrascal, 2012). Solo se pudieron corroborar 5 de las 16 mutaciones, ya que la mayoría de las mutaciones restantes presentaron una expresión muy baja o ausente en el

tumor, posiblemente debido a la diferenciación celular en las diferentes poblaciones celulares del tumor.

Tabla 12. Gen, clase y tipo de variación y efecto.

Gen	Clase de variación	Tipo de variación	Efecto
<i>BRD4</i>	Mutación con cambio de sentido	SNV	p.A1243D
<i>CCDC141</i>	Mutación con cambio de sentido	SNV	p.K992T
<i>CDK2AP1</i>	Mutación con cambio de sentido	SNV	p.R99K
<i>CLASP1</i>	Mutación con cambio de sentido	SNV	p.R276L
<i>DCHS2</i>	Mutación con cambio de sentido	SNV	p.R799H
<i>DICER 1</i>	Mutación con cambio de sentido	SNV	p.E1813G
<i>DLG5</i>	Mutación con cambio de sentido	SNV	p.R530
<i>GLG1</i>	Sitio de empalme	SNV	p.P147L
<i>MTX</i>	Cambio de marco	DEL	p.F157fs
<i>NF1</i>	Mutación sin sentido	SNV	p.R2258
<i>OBSL1</i>	Mutación con cambio de sentido	SNV	p.R994C
<i>PELP1</i>	Cambio de marco	DEL	p.P1025fs
<i>RBM5</i>	Mutación con cambio de sentido	SNV	p.G729S
<i>SCARF1</i>	Cambio de marco	INS	p.G303fs
<i>SYT6</i>	Mutación con cambio de sentido	SNV	p.S404V
<i>TAF15</i>	Mutación con cambio de sentido	SNV	p.R165L

Mutaciones deletéreas

De estas 5 mutaciones solo se pudieron validar las mutaciones expresadas en dos conductores de cáncer DICER1 y NF1. El gen DICER1, está localizado en el cromosoma 14, cuenta con 36 exones y codifica una endoribonucleasa RNasa III. La proteína Dicer ayuda en la producción de una molécula llamada microARN (miRNA). En nuestro estudio se presentó una mutación génica llamada missense es decir un cambio de sentido de aminoácidos, un ácido glutámico (Glu) por una glicina (Gly) en el lugar 1813 de la proteína (Figura 14), aún no se han descrito alteraciones en los fibrosarcomas de ovario con este síndrome, pero raramente sí se han descrito alteraciones

relacionadas con el tumor de las células de la granulosa juvenil, y pudiera ser que por tal razón la niña presentó este tipo de tumor en la recaída (Doros et al., 1993).



Figura 14. Alteraciones en el gen DICER1. Representación de la estructura de la proteína DICER1 del tumor de fibrosarcoma de ovario, que indica las posiciones aproximadas de las mutaciones DICER1. La mutación sombreada con azul representa una mutación que se identificó dentro del ARN tumoral. La posición de la mutación está encerrada en un círculo (p.E1813G) y se dio un cambio de aminoácidos p. (Glu1813Gly). El círculo de color verde representa la mutación encontrada en el ADN germinal (p.I1673fs).

En el gen NF1 se encontró una mutación génica sin sentido, este se encuentra localizado en el cromosoma 17 y da lugar a una proteína llamada neurofibromina activadora de la guanidina trifosfato llamada proteína GAP. Esta proteína cataliza la interconversión de la forma activada del ras ligada a GTP a la forma inactivada del ras ligada a GDP y tiene efecto regulador en la actividad oncogénica, además está involucrado en múltiples subtipos de tejidos blandos de sarcomas y es un supresor de tumores, se ha demostrado que pacientes con NF1 mutado generan resistencia a la respuesta de quimioterapia y radioterapia; ha sido identificado como un gen que confiere resistencia a la terapia dirigida (Figura 15) (Ballester et al., 1990; Dodd et al., 2013; Ratner & Miller, 2015).



Figura 15. Mutaciones en el gen NF1. Representación del gen NF1 del tumor de fibrosarcoma de ovario, la pérdida de la expresión de NF1 conduce a una actividad elevada de Ras, que se encarga de moderar el crecimiento celular desregulado y la tumorigénesis. La mutación encontrada está marcada con un círculo de color rojo (p.R2258).

Asimismo se encontraron mutaciones génicas con cambio de sentido en BRD4, este gen está localizado en el cromosoma 19. La proteína codificada por este gen es homóloga a la proteína murina MCAP, que se asocia con cromosomas durante la mitosis, y a la proteína RING3 humana, una serina / treonina quinasa. Cada una de estas proteínas contiene dos bromodominios, un motivo de secuencia conservada que puede estar implicado en la selección de la cromatina (Brown et al.). Es un candidato para marcadores mitóticos o epigenéticos después de la división celular y se ha relacionado con múltiples tipos de cáncer. Además la función de BRD4 en el cáncer se asocia con la transición epitelial a mesenquimal (Wu & Donohoe, 2015).

Análisis de la variación del Número de Copias (CNVs)

Los cambios en el número de copias, también conocidos como variaciones de número de copias (CNVs), son variantes genómicas estructurales que surgen de supresiones (pérdida) o duplicaciones (ganancia), es decir las CNVs son deleciones, inserciones, duplicaciones y otras anomalías citogenéticas demasiado cortas para ser vistas pero pueden incluir cientos o miles de pares de bases, y como consecuencia modifican la expresión genética, alterando los genes o el número de copias de éstos (Klopocki & Mundlos, 2011). En este estudio a nivel cromosómico se encontraron alteraciones en el número de genes y en el orden de éstos. Estos errores pudieron ocurrir durante la formación del huevo o el esperma (gametogénesis) o durante las primeras etapas de desarrollo del feto. La Figura 16 muestra la presencia de amplificaciones en largas regiones de los cromosomas 1, 2, 6, 7, 10, 17. Se encontraron grandes deleciones, que afectan el brazo largo de los cromosomas 6 y 10 y el brazo corto del cromosoma 17, aun no se han relacionado con cáncer.

También se observaron importantes mutaciones genómicas en las regiones del cromosoma 8, el cual presentó una trisomía, en estudios previos se ha demostrado que esta trisomía tiene relación

con los fibromas, y ha sido relacionado con el fibrosarcoma infantil, asimismo se considera como un marcador adecuadamente eficaz para distinguir entre fibroma celular y fibrosarcoma de ovario, también puede estar relacionado con la proliferación del fibrosarcoma (Bridge et al., 1999; Tsuji, Kawauchi, Utsunomiya, Nagata, & Tsuneyoshi, 1997).

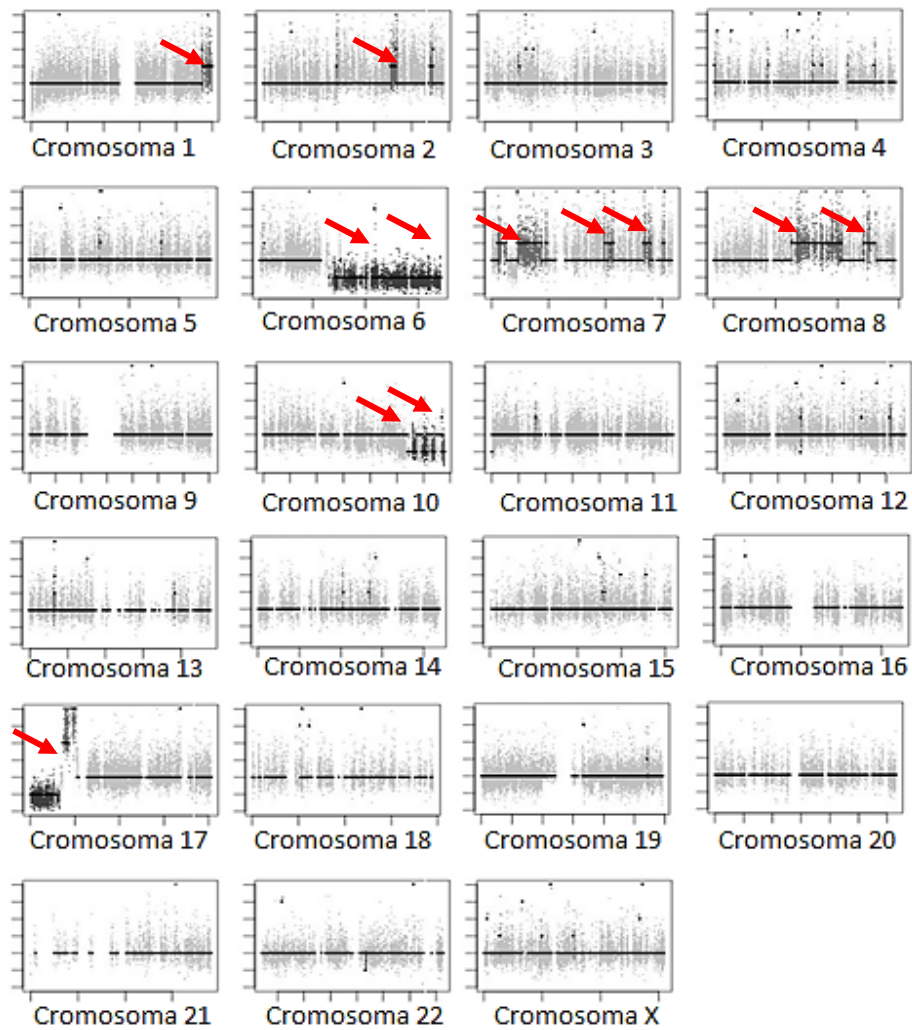


Figura 16. Alteraciones cromosómicas. Amplificación de cada uno de los cromosomas de la muestra de la paciente, se observan las alteraciones remarcadas con color negro y con flechas.

Otro hallazgo importante fueron las mutaciones en MYC; este factor regula la expresión de genes que controlan la progresión celular, la apoptosis, la diferenciación celular y tumorigenesis y se ha expresado en sarcomas convirtiéndolo en uno de los oncogenes más comúnmente activados en el cáncer humano (Barbieri et al., 2013), además tiene un comportamiento peculiar en la supresión

de TP53, asimismo MYC y TP53 se les ha relacionado que tienen que ver con las recaídas de otros cánceres (Hill et al., 2015).

Transcriptoma del fibrosarcoma de ovario

Se realizó una comparación del transcriptoma de fibrosarcoma con fibroblastomas normales en tres categorías principales Enfermedades, Funciones Celulares y Funciones de Sistema Fisiológico como se muestra en la figura 17. Como era de esperarse, la categoría más alta fue Enfermedad de Cáncer, pero las modificaciones post-traduccionales y el sistema muscular fueron el hallazgo más significativo en el estudio, porque presentaron alteraciones que tuvieron que ver en el desarrollo del cáncer en la paciente.

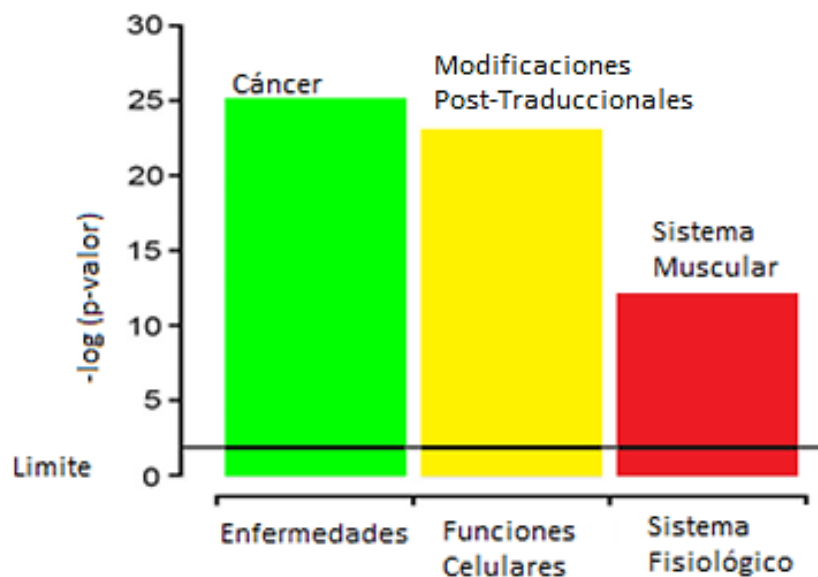


Figura 17. Función de enriquecimiento en tres categorías. Enfermedad, función celular y sistema fisiológico.

La determinación y diferenciación del linaje celular requiere eventos de señalización extracelular e intracelular para coordinar patrones específicos de expresión génica requeridos para la homeostasis celular normal. Las células musculares son el primer tipo de células que se muestran a través de la actividad de un solo ADN vinculado al factor de transcripción (Miano, 2015). Basado en lo anterior y en la figura 17, se cree que el enriquecimiento del sistema muscular tal vez fue

impulsado por un grupo de genes responsables de la regulación relacionada con el desarrollo mesenquimatoso, por lo que los cambios en la expresión génica que llevaron a la activación del mesénquimal, fueron coordinados por un grupo de reguladores principales mesenquimatosos incluyendo MYOCD, TBX5 y HAND2 (Figura 18). Las alteraciones en la expresión génica de MYOCD están asociado con varias enfermedades incluyendo cáncer y sea demostrado que actúa como supresor de tumores (Miano, 2015). TBX5 sea identificado como supresor de tumores (Yu et al., 2010). HAND2, está relacionado con cáncer endometrial (Jones et al., 2013), asimismo también reveló una gran miogénesis, apoyando aún más en el desarrollo del fibrosarcoma de ovario.

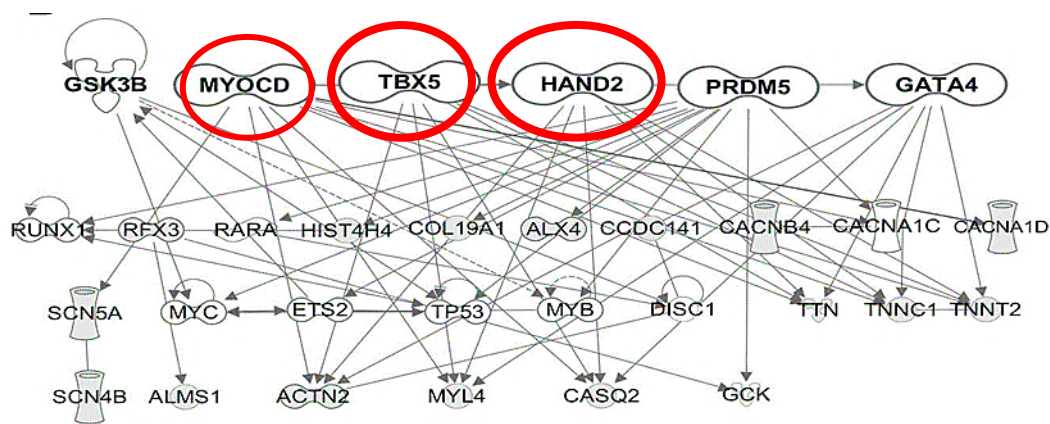


Figura 18. Cascada transcripcional del gen MYC. 1. La proteína MYC realiza sus múltiples actividades a través de la regulación transcripcional de sus genes blanco.

Entre las principales redes reguladas en el tumor, se encontró una cascada de GLI1 (Figura 19), que podría ser una de las principales vías involucradas en esta neoplasia. Las mutaciones génicas de GLI1 se localizan en el cromosoma 12, cuando se desregula la vía Hedgehog conduce a la tumorigénesis y apoya fenotipos más agresivos de cánceres humanos, tales como progresión, metástasis y resistencia terapéutica, asimismo, contribuyendo a importantes características de

células cancerosas (Carpenter & Lo, 2012). De acuerdo a lo mencionado anteriormente se puede decir que GLI1 fue una pieza clave para el desarrollo del fibrosarcoma de ovario en la paciente.

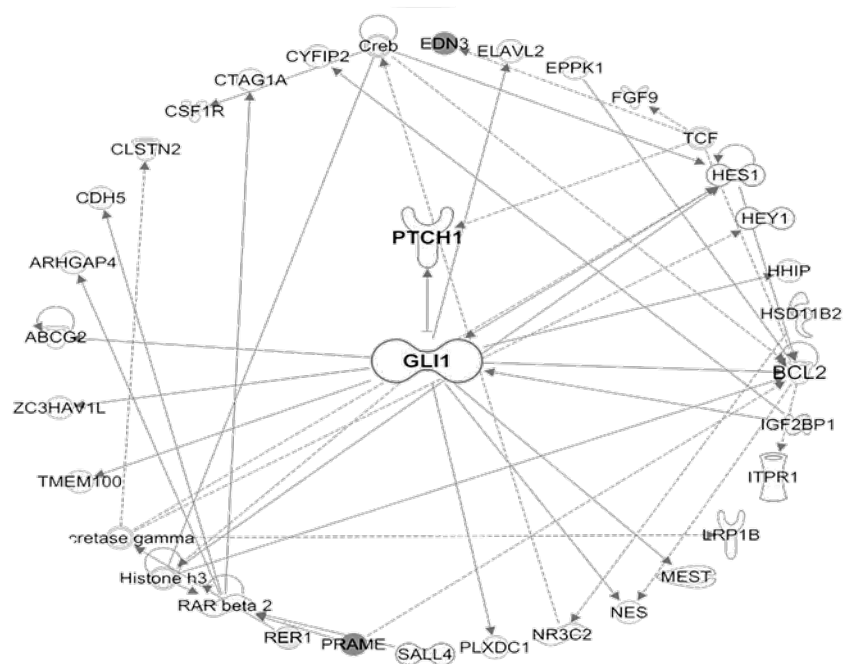


Figura 19. Vía Hedgehog (Hh), expresión de GLI1. El factor de transcripción de GLI1, es un efector descendente clave de la vía de señalización Hedgehog, que funciona a través de un complejo membrana-proteína que consiste en Patched-1 (Ptch1). Fisiológicamente, la activación de la señalización Hh se inicia por la unión del ligando Hh al receptor Ptch1. Específicamente, Gli1 actúa como un activador transcripcional.

Regiones no codificantes

También se encontraron varias mutaciones en regiones no codificantes de ARN, anteriormente se consideraba que estos no tenían ninguna funcionalidad, pero en la actualidad esta idea ha cambiado, son claramente funcionales y desempeñan papeles clave como la regulación del ciclo

celular, la apoptosis y el establecimiento de la identidad celular (Ulitsky & Bartel, 2013). Asimismo están implicados en la desregulación génica en numerosos tipos de cáncer y han surgido como una serie de moléculas reguladoras que participan en una amplia gama de procesos biológicos y patológicos, estas regiones no codificantes son descritas como lincARNs y las podemos observar en la tabla 13.

Tabla 13. LincRNAs mutado; Cr. Cromosoma; Inicio y fin: Ubicación del gen; Tipo de variación: INS: inserción; DEL: Delección

<i>lincARNs</i>	<i>Cr.</i>	<i>Inicio</i>	<i>Fin</i>	<i>Tipo de variación</i>	<i>Alelo de ref.</i>	<i>Alelo de tumor</i>
<i>RP11-417J8.6</i>	1	142657355	142657356	INS	-	T
<i>RP11-526A4.1</i>	4	150526021	150526021	DEL	G	-
<i>RP11-146I2.1</i>	6	15021515	15021516	INS	-	C
<i>AC147651.1</i>	7	534289	534290	INS	-	GA
<i>RP11-149P24.1</i>	8	137130960	137130961	DEL	TG	-
<i>LINC00469</i>	17	71754131	71754134	DEL	TCTC	-
<i>RP11-325K19.1</i>	18	58554075	58554076	DEL	GT	-
<i>RP11-567M16.3</i>	18	77408917	77408919	DEL	GGT	-

lncARNs en fibrosarcoma de ovario

Recientemente los lncARNs de todo tipo han estado implicados en una serie de procesos y desarrollo de enfermedades, y casi la totalidad del genoma de los mamíferos se transcribe en transcripciones no codificantes funcionales. Se ha descrito que DICER1 juega un papel crucial en la maduración de ARNs, no codificantes que regulan la expresión génica posttranscripcional del genoma (Wang et al., 2015).

Para conocer si lo descrito anteriormente estaba presente en la muestra de fibrosarcoma de ovario (FS), se realizó una comparación de la proporción de lincARNs, expresados con mARNs en la

muestra, con fibroblastos normales, y se encontró claramente una disminución en el número de lincARNs (Figura 20). La importancia de la comparación de esto, es porque se ha demostrado que cada vez hay más evidencias de que los lincARNs son mediadores de oncogénes o supresión de tumores (Li et al., 2015).

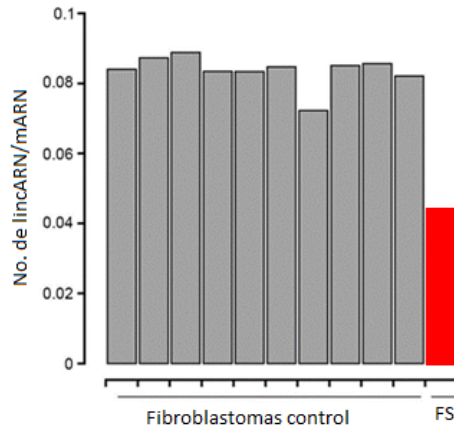


Figura 20. Frecuencia de LincARN en comparación de fibroblastomas control con la muestra de fibrosarcoma.

Tomando en cuenta el comportamiento de los lincARNs se hizo una separación de lincARNs de los mARNs y se obtuvo un resultado inesperado, el nivel de expresiones de lincARNs del fibrosarcoma fue mayor que los fibroblastos control, lo que quiere decir que tuvieron una gran participación en la regulación específica del tumor (figura 21).

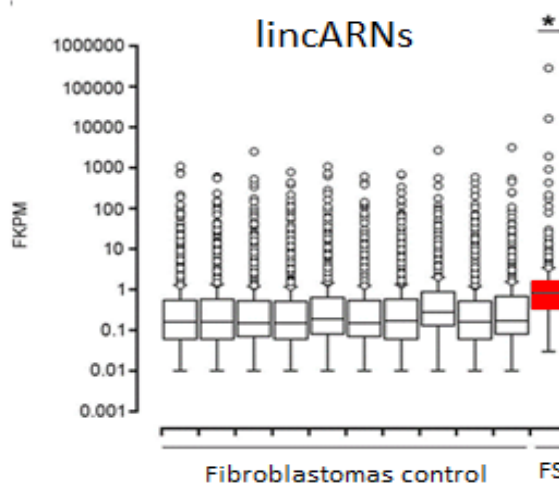


Figura 21. lincARNs expresados en fibrosarcoma de ovario de la paciente, en relación a cáncer. El análisis estadístico de la muestra se representa mediante una gráfica de cuartiles, en donde se tomaron en cuenta fibroblastomas control para compararlos con el fibrosarcoma de ovario, donde FKPM fueron mayores en el fibrosarcoma que en los fibroblastomas control.

Hay que destacar que el ARN contienen información clave, para la búsqueda de variantes funcionales, por lo que la idea de la posibilidad de la reducción de la mortalidad por cáncer, mediante la identificación y el seguimiento de biomarcadores es muy importante, ya que algunos biomarcadores son lincARN, dado que los pares de lincARN están asociados con los procesos biológicos relacionados con el cáncer (Li et al., 2015). De los lincARNs expresados en el tumor solo 13 de ellos tiene relación con cáncer, por lo tanto, el resultado anterior fue apoyado por los lincARN oncogénicos que se encontraron en el tumor y se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. lincARNs. Relacionados con cáncer, presentes en el tumor

<i>lincARNs</i>	<i>lincARNs</i>
<i>XIST</i>	LINC00626
<i>MIR181A1HG</i>	RP11-191L9.4
<i>MALAT1</i>	FIRRE
<i>RMRP</i>	MIR99AHG
<i>TSIX</i>	NBAT1
<i>CASC15</i>	RP11-161M6.2

Mutaciones Germinales

Con el fin de buscar una explicación más para este estudio, se realizó secuenciación de exoma germinal de la paciente. Las mutaciones germinales son un cambio genético en las células reproductoras del cuerpo (óvulo o espermatozoide), este tipo de mutaciones se transmiten de padres a hijos. En los resultados obtenidos se localizaron dos mutaciones que anteriormente se mencionaron. Sorprendentemente, la mutación del gen DICER1, consistió en una inserción de cambio de marco. Se predice que produce una proteína truncada funcional. Este hallazgo se verificó mediante la secuenciación de Sanger tanto en el ADN tumoral como en el germinal, así como en el ARN derivado del tumor. En la figura 22 podemos observar la secuenciación de las muestras y se ve claramente una inserción.

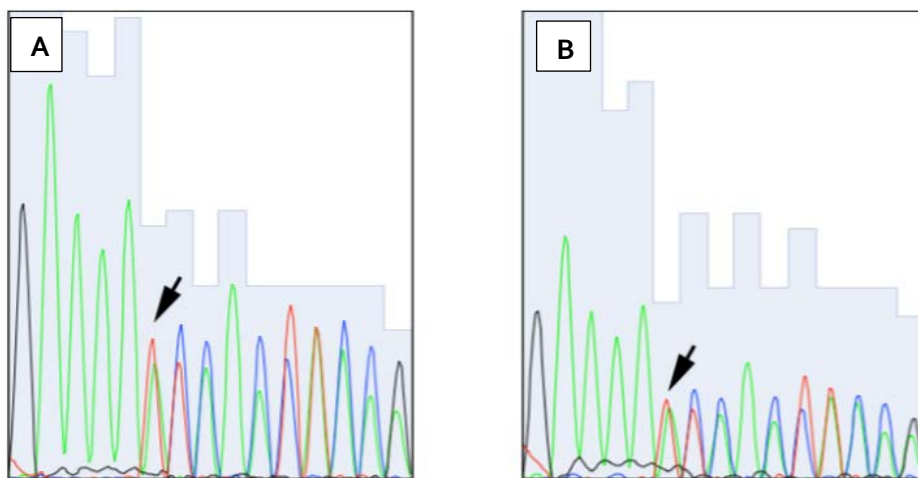


Figura 22. Secuenciación de Sanger tumoral y germinal. A. Secuenciación del tumor y muestra una inserción. B. Secuenciación germinal y muestra inserción.

↓

WT	AAAATTTTGAAAAGAAAATCAACTACAGATTCAAGAATAA
MT	AAAATTTTGAAAAGAAAATCAACTACAGATTCAAGAATA
ARN	AAAATTTTGAAAAGAAAATCAACTACAGATTCAAGAATAA
ARNa	AAAATTTTGAAAAGAAAATCAACTACAGATTCAAGAATA

Figura 23. Secuencia en cadena de nucleótido. (WT) Representa la secuenciación de una cadena de nucleótidos de molde. (MT) Muestra la mutación que se presentó en la secuenciación de exoma obtenido a partir de ARN (ARN y ARNa).

Para validar este hallazgo, se secuenció la región alterada en el ADN germinal derivado de los padres y hermanos. La figura 23 muestra que sólo la paciente presentó la mutación en DICER, mientras que la figura 24 muestra que ninguno de sus familiares presentó la mutación, por tanto se puede decir que fue una mutación de novo, aunque no podemos excluir el mosaicismo de la línea germinal en uno de los padres o hermano.

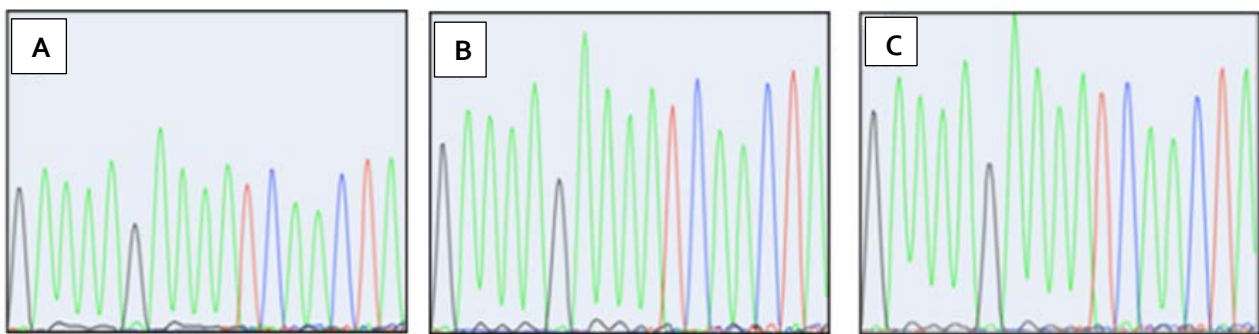


Figura 24. Secuenciación de sanger en la familia. A. Padre B. Madre. C. Hermano con tumor de Wilms. Se observa encada una de las imágenes que ninguno de los tres familiares presentó la mutación.

En los últimos años, la secuenciación masiva (SNG) ha revolucionado el enfoque de los estudios genéticos que permite obtener millones de secuencias de ADN a un costo cada vez más reducido y ha contribuido para un mejor entendimiento de la biología humana y la medicina, proporcionando una única referencia para toda la información genética. Estos avances nos ayudan a poder identificar variantes genéticas que pueden estar asociadas a la predisposición a diferentes tipos de cáncer, ya sean raros o frecuentes, y de esta manera establecer medidas de prevención, diagnóstico y tratamiento (Rodríguez-Santiago & Armengol, 2012).

Aunque la Promoción de la salud nace por una creciente necesidad de un nuevo concepto de salud, y propone que las condiciones y requisitos para la salud son: la paz, la educación, la vivienda, la alimentación, un ecosistema estable, la justicia social y la equidad. Cualquier mejora de la salud ha de basarse necesariamente en estos prerrequisitos, sin embargo se considera que no se debe hacer a un lado el modelo hegemónico (médico preventivista), ya que siempre estaremos ligados a ese modelo por la importancia de prevención (WHO, 1986).

En este estudio se incluyeron 220 niños y adolescentes con diagnóstico de cáncer infantil. Tras el análisis descriptivo del grupo en estudio se observó una mayor frecuencia del sexo masculino con un 52.7%, y se dice que los tumores infantiles son más frecuentes en el sexo masculino que el femenino, asimismo niños en edades de 5-8 años con un 27.7%, este dato es posible porque la mayoría presento LLA y la edad promedio de aparición de esta enfermedad es de 2-8 años (Navajas & Peris, 2007). En este estudio reafirmamos lo que dicen otros autores que los tumores infantiles son más frecuentes en sexo masculino que en el femenino.

Según la literatura, en México las enfermedades con mayor predominio que se presentan en pediatría son la Leucemias Aguda Linfoblástica (LLA), Linfomas y tumores del Sistemas Nervioso

Central (SNC) (CeNSIA, 2015; Ramírez, 2012), lo cual concuerda con nuestro estudio. Las enfermedades de mayor incidencia fueron la LLA, SNC, sin embargo, tenemos una alta frecuencia de tumores hepáticos debido a que el HIM es un centro de referencia para cirugía hepática pediátrica.

La mayoría de las enfermedades están influenciadas tanto por factores genéticos como por factores ambientales. La herencia familiar, ha sido y sigue siendo de primordial importancia en los procedimientos de evaluación de riesgo de cáncer (Gibbon, 2011). Narod y Cols. (1991), mencionan que aproximadamente el 10% de los pacientes pediátricos tiene predisposición genética (Narod et al., 1991).

El cáncer en edad pediátrica es completamente diferente al de los adultos porque la patología es diferente, es decir tiene diferente origen y comportamiento clínico. La mayoría de los tumores que se presentan en edad pediátrica son de origen embrionario, en muchos estudios realizados no se han demostrado que los factores ambientales influyan en su desarrollo, por lo contrario en los adultos, la mayoría de los cánceres que presentan son por factores ambientales a los que se expusieron (Valdespino-Gómez & Valdespino-Castillo, 2016).

Marjolijn y Jongmans, proponen un cuestionario de predisposición genética que está basado en 5 preguntas: historia familiar antes de los 45 años, Tipos de tumores específicos, Múltiples tumores primarios, Características especiales y Toxicidad severa, mencionan que el conocimiento de estas cinco características ayudan a seleccionar pacientes con un alto riesgo de predisposición genética, sin embargo hay otros autores que mencionan que hay una probabilidad de que el riesgo de cáncer se incremente tras la exposición preconcepcional, intrauterina y posnatal a diferentes carcinógenos (Jongmans et al., 2016) (Ferris-Tortajada, Ortega-García, Marco-Macian, & Garcia-Castell, 2004)

Tras la evaluación dentro del estudio detectamos que 59 de estos pacientes tienen familiares con cáncer < 45 años, lo que resulta que un solo gen puede causar la aparición temprana del cáncer a partir de sus patrones de herencia (Lee & Ahmed, 2003).

Los resultados analizados que obtuvimos del cuestionario genético fue el 40.9% de los niños tuvo un criterio para la predisposición genética, Marjolijn y Jongmans, mencionan que se necesita solo de un criterio para que una enfermedad sea heredada de generación a generación. Gracias al conocimiento de estos resultados nos ayuda a seleccionar pacientes con alto riesgo de predisposición genética e identificar quien podría beneficiarse de la atención de un genetista. Sin embargo, la edad de aparición del cáncer difiere notoriamente dentro de una misma familia o entre familiares portadores de una misma familia.

Los resultados de quienes propusieron el cuestionario y los resultados obtenidos en el estudio difieren bastante, esto puede deberse tanto a la información que proporcionaron los familiares de los pacientes de si es 100% confiable pues podían no tener la información correcta.

Sin embargo, junto con la historia clínica completa de cada paciente y la prueba molecular es una herramienta adicional para el diagnóstico de síndromes hereditarios, ya que puede ayudar a establecer un diagnóstico clínico o presuntivo del cáncer.

Aunque una combinación de factores genéticos y ambientales explica la posible tumorigénesis, la mayoría de los niños según los resultados no han tenido exposición significativa a largo plazo a los factores ambientales, por lo que podemos suponer que en este grupo de edad la principal causa del cáncer es por alteraciones genéticas y epigenéticas durante su desarrollo (Gibbon, 2011)

De los 220 niños sólo se realizó secuenciación de 18 pacientes y sólo se tomó el caso de una niña de 7 años de edad, con antecedentes patológicos significativos, herencia familiar de cáncer de

ovario y hermano con tumor de Wilms, dicha niña recibió un diagnóstico de fibrosarcoma de ovario, este tipo de tumor representa el 4% aproximadamente de todas las neoplasias ováricas (Jongmans et al., 2016). El fibrosarcoma de ovario es un tumor muy poco frecuente, pero se puede presentar en cualquier edad, aunque más del 50% de los pacientes son posmenopáusicas o de baja paridad (Valdespino-Gómez & Valdespino-Castillo, 2016). Pocos casos de fibrosarcoma de ovario han sido reportados previamente, en México aún no se ha reportado otro caso, como este, por tal rareza fue que se decidió realizar el estudio.

La paciente presentó un criterio del cuestionario genético, el de herencia familiar, ya que, tres de sus familiares presentaron cáncer antes de los 45 años de edad, lo que quiere decir que pudo haber sido hereditario el cáncer que presentó, sin embargo, a continuación se explica a detalle los resultados obtenidos de la secuenciación.

Secuenciación de la muestra

En la actualidad se ha optado por realizar secuenciación de exoma, ya que más del 90% de las mutaciones y polimorfismos asociados a enfermedades se sitúan en las regiones codificantes de las proteínas y por tanto en el exoma (Botstein & Risch, 2003; Stenson et al., 2009) Para este estudio se utilizaron muestra del tumor y de sangre periférica de la niña, se utilizó una genoteca basada en CCDA y RefSeq genes, con aproximadamente 18,560 genes (32,7 Mb), la secuenciación se realizó utilizando Illumina HiSeq 2000, posteriormente se realizó variant calling. Se obtuvieron 34 variantes de un solo nucleótido (SNV) y 286 pequeñas inserciones (INS) y deleciones (DEL), ambas con una alta confianza, por lo que se encontró una baja tasa de mutación (0.77 / Mb), sin embargo, según la literatura es típico que ocurra esto en tumores pediátricos. Para validar estos resultados se realizó secuenciación de ARN.

Mutaciones encontradas

Por otro lado, el utilizar algoritmos de alineamiento de manera complementaria ha resultado un paso clave a la hora de detectar variantes de potencial interés en el estudio, esto permitió generar una lista de genes que incluían las mutaciones, 16 de estas mutaciones cumplieron con los criterios de SNV, INS y DEL, de estas 16 mutaciones se corroboraron 5, pero solo se validaron dos de las mutaciones identificadas en el exoma de la niña, ya que están relacionados como conductores de cáncer. El gen DICER1 y NF1, dichas mutaciones se discutirán a continuación así como su participación en la oncogénesis.

Síndrome de DICER1

El gen DICER 1 es un miembro de la familia ribonucleasa III (RNasa III), participa en la generación de microARN (miRNAs), que modulan la expresión génica a nivel postranscripcional, posee un motivo de ARN helicasa que contiene una caja de DEXH en su extremo amino y un motivo de ARN en su extremo carboxilo DICER, también conocido como helicasa-MOI, lo que permite que se reprima la expresión oncogénica. Se localiza en el cromosoma 14q32.13 (figura 25) (Rio Frio et al., 2011). Las mutaciones implican cuatro aminoácidos separados en el dominio de la RNasa IIIB que son críticos para la unión a los iones metálicos y la actividad de las endonucleasas de ARN (Anglesio et al., 2013).

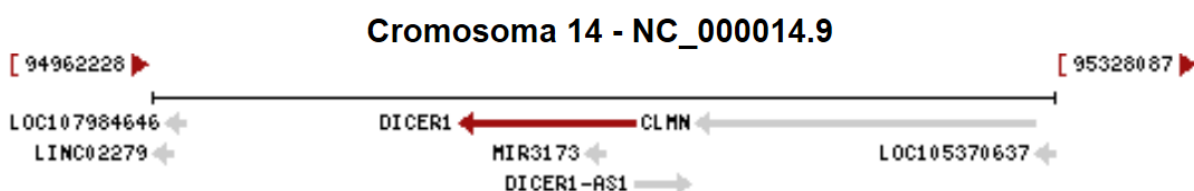


Figura 25. Localización del gen DICER1, cromosoma 14.

Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23405>.

Las mutaciones en la línea germinal DICER1 se asocian con tumores embrionarios como el blastoma pleuropulmonar (PPB), nefrona quística, tumores celulares de Sertoli-Leyding, médulo epitelomas, tumor de las células de la granulosa juvenil y rabdiomiosarcomas embrionarios (Canfarotta, Riba-Wolman, Orsey, Balarezo, & Finck, 2016).

El gen DICER1 presentó una mutación que género un cambio de aminoácido en la proteína, de un ácido glutámico (Glu) por una glicina (Gly) en la posición 1813, lo que representa una mutación compleja de inserción, las mutaciones en este sitio del gen no se han identificado en fibrosarcomas.

Diversos estudios han sido realizados con el propósito de conocer su asociación con diversos tipos de cáncer, y han demostrado que las personas afectadas con este tipo de síndrome pueden desarrollar uno o más tipos de tumores y los miembros de la misma familia pueden tenerlo y desarrollar otro tipo de tumores, sin embargo, el riesgo de formación de tumores en pacientes con este síndrome aumenta moderadamente (Schultz et al., 2014). En relación a esto y lo que ha presentado la niña, se deduce que este síndrome de DICER1 es el principal causante tanto del fibrosarcoma de ovario como del tumor de las células de la granulosa juvenil que presentó en la recaída la niña, este tipo de tumor si se ha representado raramente en pacientes con este síndrome de DICER1. Estos resultados representan una de las grandes contribuciones conocidas de las mutaciones de la línea germinal de un solo gen en un tipo de tumor específico.

En un estudio previo de este síndrome DICER1 encontraron que 7 de 823 pacientes afectados presentaron fibrosarcoma, aunque nosotros estudiamos solo uno pudimos darnos cuenta de la importancia de los resultados, para que la niña esté bajo vigilancia médica por la aparición de otros tumores, ya que este síndrome es caracterizado por la aparición de múltiples tumores.

La mayoría de las personas con síndrome DICER1 lo heredan de alguno de sus padres. Sin embargo, este síndrome DICER1 es nuevo en esta niña lo que quiere decir que los resultados obtenidos demostraron que ninguno de los padres lo tiene, pero lo más importante y curioso fue que su hermano quien presentó tumor de Wilms, también se le realizó el estudio y no se encontró en sus células, posiblemente sea un individuo mosaicismo. Un organismo mosaico está compuesto de dos o más poblaciones celulares genéticamente distintas derivadas de un cigoto genéticamente homogéneo (Kouzak, Mendes, & Costa, 2013), es decir que el hermano puede tener el síndrome pero en las células extraídas no lo contenía, por tal razón se invitó a los padres e hijos a realizarse nuevamente el estudio.

La alteración genética que ha ocurrido en la niña es una mutación nueva en las células germinales antes de la fecundación o en una célula del feto en desarrollo, lo que se llama mutación de Novo. Cuando estos procesos surgen, todas las células del niño llevan este cambio genético, por tanto aunque la niña haya presentado uno de los criterios de predisposición genética, como se mencionó anteriormente no se encontró este síndrome en los padres, en consecuencia no fue heredado, sin embargo queda la duda en el padre por que no se hicieron pruebas de paternidad. Lo que quiere decir que los cuestionarios genéticos no determinan del todo la predisposición al cáncer, por eso es importante que la mayoría de los pacientes puedan realizarse pruebas genéticas, sin embargo, si podría ser una herramienta importante para invitar a muchos pacientes a participar en proyectos de investigación sobre cáncer, ya que el cuestionario nos daría la pauta para informar a los pacientes de la importancia de las pruebas genética, las cuales les permitiría saber si fue heredada o no la enfermedad y que porcentaje tendrían para herédaselo a otro miembro de la familia.

Gen NF1

El gen *NF1* codifica la neurofibromina, una proteína citoplasmática que se expresa predominantemente en neuronas, células de Schwann, oligodendrocitos y leucocitos. Se localiza en el cromosoma 17q11.2 (figura 26) y tiene diferentes funciones bioquímicas, incluyendo la asociación a los microtúbulos y la participación en varias vías de señalización. Es una molécula multidominio con la capacidad de regular varios procesos intracelulares, incluyendo el RAS (Trovo-Marqui & Tajara, 2006).

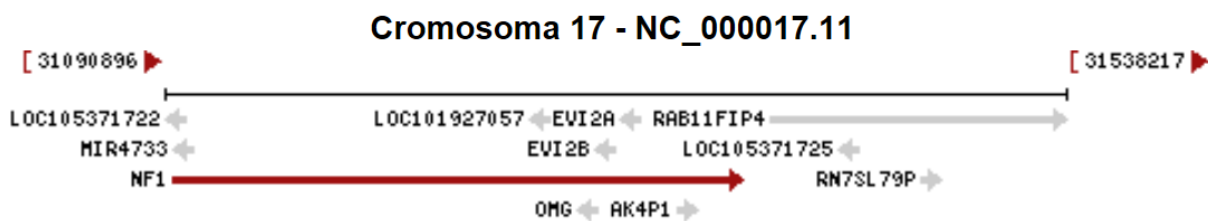


Figura 26. Localización de NF1 en el cromosoma 17.

Estudios anteriores han demostrado que el gen *NF1* actúa como supresor de tumores y se espera que la mayoría de los pacientes con *NF1* tengan mutaciones heredables (Cappione, French, & Skuse, 1997), pero sólo pocos se han caracterizado hasta ahora, por lo que se ha demostrado que este gen tiene una alta tasa de mutaciones espontáneas (Boyd, Korf, & Theos, 2009), en nuestro estudio encontramos una mutación *de novo*, lo que reafirma lo antes dicho.

Alteraciones en cromosomas 8, 10, 17

En la figura 15 se muestran la amplificación de los cromosomas 8, 10 y 17 y se observan alteraciones, estos cromosomas han sido relacionados con algunos tipos de cáncer, pero hasta el momento el único relacionado con fibrosarcoma de ovario es el cromosoma 8, se menciona que en una trisomía es un marcador que distingue los fibromas ováricos de los fibrosarcomas y se

encuentra en el gen MYC, el cromosoma 10 aún no ha sido relacionado con fibrosarcoma de ovario pero si con neurofibrosarcoma, pero además también está relacionado con el gen MYC como supresor de tumores. Asimismo el cromosoma 17 está relacionado TP53 el cual se caracteriza por ser un supresor de tumores y hay una expresión alta en cáncer de ovario (Schuijjer & Berns, 2003)

Gen MYC

El protooncogen MYC codifica un factor de unión al ADN que puede activar y reprimir la transcripción. Mediante este mecanismo, MYC regula la expresión de numerosos genes diana que controlan las funciones celulares clave, incluyendo el crecimiento celular y la progresión del ciclo celular. MYC también tiene un papel crítico en la replicación del ADN. Expresiones de MYC resultante de varios tipos de alteraciones genéticas conduce a la actividad constitutiva MYC en una variedad de cánceres y promueve la oncogénesis (Ramsay, Evan, & Bishop, 1984). El gen MYC se encuentra en el cromosoma 8 como se muestra en la figura 27 (Brown et al.).

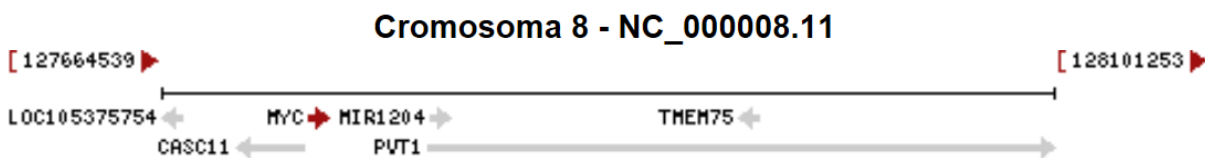


Figura 27. Localización de MYC en el cromosoma 8.

Asimismo el cromosoma 10 está relacionado con la expresión del gen c-myc, que produce un factor de transcripción oncogénico, y con frecuencia se descontrola en cánceres humanos. La proteína codificada por este gen es un represor transcripcional que regular negativamente la función MYC, y por lo tanto es un potencial supresor de tumores (Brown et al.)

Gen TP53

Diversos estudios han demostrado que el gen TP53 responde a diversas tensiones celulares para regular los genes diana que inducen la detención del ciclo celular, la apoptosis, la reparación del ADN o los cambios en el metabolismo. Además, TP53 parece inducir la apoptosis mediante procesos citoplasmáticos no transcripcionales (Bourdon, 2007). Este gen está localizado en el cromosoma 17 p13.1 (figura 28) y codifica una proteína supresora de tumores (OMIM 191170).

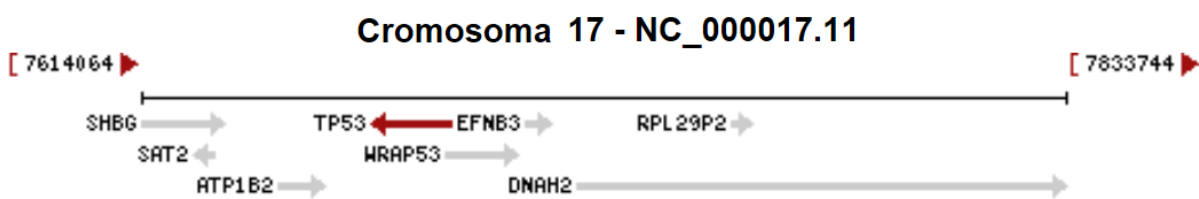


Figura 28. Localización del TP53 en el cromosoma 17.

Numerosas modificaciones postraduccionales modulan la actividad de TP53, especialmente la fosforilación y la acetilación. La actividad de TP53 se pierde omnipresente en el cáncer humano ya sea por mutación del propio gen TP53 o por pérdida de la señalización celular de TP53.

Como era de esperarse la probabilidad de que este gen estuviera mutado en la niña era muy grande, ya que, contribuye al desarrollo de la mayoría de los cánceres humanos y uno de los principales es en ovario. Según los datos sobre la prevalencia de la mutación en cáncer de la base de datos IARC TP53, muestran que las mutaciones en ovario están en primer lugar con el 47.8% (Hernandez-Boussard, Rodriguez-Tome, Montesano, & Hainaut, 1999). Con base a los resultados de enfermedades, Función Molecular y Celular y Función del Sistema Fisiológico, podemos decir que se encontró un alto porcentaje en Enfermedad de cáncer.

por MYC y TP53 que están relacionados con cáncer y le agregamos G11 que está relacionada con ser una vía de señalización para desarrollar tumores agresivos.

El objetivo de realizar secuenciación de exomas es la detección de mutaciones, para poder iniciar un tratamiento médico temprano o para prevenir el cáncer en otros miembros de la familia afectados. Sin embargo, nuestras limitaciones para solo realizar un estudio fueron, los altos costos que este tipo de proyectos conlleva, aunque la secuenciación de exoma es más accesible se requiere de capital para realizarse, por otra parte también la participación de los pacientes es otra limitante, ya que muchas de las personas no tienen conocimiento de la realización de estos proyectos o la perspectiva que tienen sobre ellos es ambigua, pero algunos de los que sí tienen poco conocimiento de los proyectos deciden no hacerlos por miedo a saber quién es el portador de la enfermedad, claro ejemplo de esto es de la propia familia de la niña, sólo la madre decidió recibir los resultados mientras que el resto de la familia, dijo que preferían no saber nada.

Sería importante que se realizará un trabajo exhaustivo, en el que los promotores de la salud les explicaran la importancia de estos estudios tanto a familias sin y con pacientes con cáncer, lo cual le corresponde al médico, pero no lo hacen, porque algunos solo se dedican a ver al paciente como alguien más que curar, aquí es donde el promotor de la salud jugaría un papel muy importante al transmitirles el conocimiento necesario a las familias y pacientes sobre los proyectos y el beneficio que tiene el participar en ellos y además el conocer si ese tipo de cáncer se lo pueden heredar a sus próximas generaciones o no.

El estudio de predisposición genética en esta población es importante, ya que la mayoría de los cánceres en edad pediátrica son por mutaciones genéticas, sin embargo hay estudios que mencionan que debido a su proceso de desarrollo, son expuestos a influencias tanto de carácter biológico como ambientales, por lo que el origen del cáncer infantil es multifactorial e incluye una

diversidad de factores medioambientales y genéticos, pero algunas alteraciones genéticas predisponentes podrían tener un origen medioambiental, ya que dichos factores podrían actuar antes del nacimiento o de la concepción, por tanto podrían generar mutaciones *de novo* (Navajas & Peris, 2007)

Los datos obtenidos del cuestionario de predisposición genética pueden ser dudosos y es difícil concluir algo definitivamente, esto se puede explicar por las limitaciones en las averiguaciones y la información obtenida en la población de estudio.

Es importante mencionar que no se han reportado estudios previos al nuestro, ya que este tipo de cáncer pediátrico hasta donde se sabe no se ha presentado en la población mexicana. Pero cabe la posibilidad que en un futuro este tipo de enfermedad presente en algún otro paciente o que este síndrome de DICER1 genere algunos otros tumores raros en niños.

Por lo tanto, nuestro estudio es un aporte significativo para la población en general, puesto que, nuestros resultados demostraron el efecto de una mutación genética, que fue evaluado en un paciente con el síndrome DICER1, el cual genera múltiples riesgos para desarrollar diferentes tumores, lo que puede potenciar el riesgo de cáncer en otras partes del cuerpo de la niña y en quienes sean portadores del mismo. Pero realmente no descartamos que un miembro más de la familia lo tenga, como se mencionó anteriormente, puesto que pueden ser individuos mosaicismos, por lo que se recomienda un segundo estudio para poder confirmar estos resultados.

La importancia de este estudio radica en que este tipo de síndrome que causan múltiples tipos de patologías sea detectado a tiempo y problemas como el de la niña sean resueltos oportunamente. Es relevante tomar en cuenta que la acción o efecto de un determinado gen alterado genera variaciones que pueden ser en sí mismas perjudiciales y estar relacionadas a la enfermedad. El

mapeo genético y la ubicación de los verdaderos sitios relevantes de los posibles genes responsables de la patología, es significativo para que se genere un mejor diagnóstico, tratamiento y cuidado. La participación de los promotores de salud en este tipo de investigaciones es de gran importancia ya que nos permite crear modelos de cuidado centrados en el paciente que consistan en el diseño de terapias, de tal forma que se favorezca la mejor prescripción posible con la mayor eficacia y seguridad, asimismo que facilite la toma de decisiones informadas sobre la enfermedad por parte de los pacientes o de sus padres o tutores responsables de ellos.

Este tipo de proyectos no estudia sólo la enfermedad si no un poco más allá, sería importante ver la influencia que estos resultados pueden causar en las familias, aunque algunos autores dentro de la promoción de la salud, mencionan que la prevención de enfermedades es un modelo hegemónico (médico preventivista) que debe cambiarse, nosotros vemos que este es un tanto imposible puesto que la prevención de enfermedades se puede utilizar como un término complementario para esta disciplina, y como menciona la OMS la prevención de enfermedades abarca medidas destinadas no solamente a prevenir la aparición de enfermedades, sino a la reducción de los factores de riesgo, a detener su avance y atenuar sus consecuencias una vez establecidas.

En el estudio se analizaron los indicadores de predisposición genética a cáncer en 220 niños diagnosticados con cáncer pediátrico. Se clasificaron conforme a las preguntas del cuestionario de predisposición genética, se concluyó lo siguiente, el 26.8% tienen historia familiar en < 45 años, el 28.6% tuvo un tipo de tumor específico de los que según los autores del cuestionario son de predisposición genética, 0% tuvo múltiples tumores primarios, el 5.9% presentó una característica especial, como síndrome de Down y anemia antes de su diagnóstico y por último el 22.7% presentó toxicidad severa.

La implementación de tecnologías de NGS para la secuenciación de exomas es una herramienta útil para el estudio de las enfermedades hereditarias en línea germinal, que ayuda a la investigación para explicar las bases genéticas de las enfermedades de cáncer. Esto ha permitido identificar tanto variantes genéticas, como nuevas especialmente variantes poco frecuentes y raras principalmente en cáncer.

A partir del análisis de los resultados del caso de la niña, se sugiere que el desarrollo del fibrosarcoma de ovario a edad y el tumor de células de la granulosa juvenil a edad temprana, está principalmente relacionados con el síndrome DICER1 en una mutación de *novo*, ya que esta mutación no se encontró en la familia, pero no se descarta que no lo tenga, ya que pueden ser individuos mosaicismos.

El hecho de que una de las dos mutaciones principales en el desarrollo de cáncer de la niña, se sitúa en el gen DICER1, siendo este un gen como candidato en los principales cánceres, sustenta las teorías que relacionan esta enfermedad con múltiples tumores como se presentó en la niña.

Los resultados del este estudio apoyan la hipótesis de que una parte de la heredabilidad del cáncer se puede explicar a través del cuestionario de predisposición genética y otra parte mediante las mutaciones que inciden en el desarrollo del cáncer a través de la investigación genética, ya que pueden surgir mutaciones de *novo*.

Ante el alto índice de muertes por cáncer en edad pediátrica y la obtención de los resultados de las investigaciones se hace necesaria la articulación de la promoción de la salud y la prevención primaria para la implementación de programas encaminados hacia el beneficio tanto del paciente como de las familias, para mejorar su calidad de vida.

La participación del promotor de la salud en investigación podría ser una herramienta eficaz y efectiva en la promoción de la salud siempre y cuando se incluyan aspectos inherentes al ser humano, de igual forma, se hace necesario la participación de la comunidad para la generación de nuevos proyectos que contemplen la prevención del cáncer y la concientización para la disminución de los factores de riesgo que posibilitan la adquisición de patologías que puedan traer a largo plazo deterioro de su calidad de vida.

A partir de los resultados obtenidos del estudio, se genera un reciente conocimiento que da pie a realizar nuevas investigaciones y es posible proponer las siguientes perspectivas:

1. Es importante tanto la mejoría de los medios de diagnóstico que detecten a tiempo el cáncer pediátrico, como los tratamientos quirúrgicos, quimioterapéuticos que actúen eficazmente en enfermedades tumorales avanzadas, ya que pueden ayudar a obtener una mayor supervivencia de los pacientes.
2. Es conveniente que más adelante la familia se realice nuevamente un estudio genético con el fin de obtener mayor información y se descarte que son organismos mosaicismos.
3. En cuanto a la relación de la comunidad con estas investigaciones sería cuestión que los promotores de la salud, acercaran este conocimiento a la población para que esta participe y se logre tener estudios más grandes para una mejor validación de los resultados y no solo de un caso.
4. Mediante la Promoción de la Salud se podría generar una concientización de la importancia de la detección temprana del cáncer infantil, y se podría sugerir la mejora de la infraestructura hospitalaria que ayude a un diagnóstico temprano y eficaz.
5. Es importante la creación de programas a través de los promotores de la salud, que estén orientados a dar información sobre los síndromes relacionados con cáncer y también para dar apoyo económico y moral tanto en los pacientes como en sus familias.

GLOSARIO

A

- ADN
Ácido desoxirribonucleico 13, 14, 15, 16, 28, 29, 30, 31, 32, 55, 56, 57, 60, 63, 73, 74, 75, 83, 84, 99
- ADNc
Ácido Desoxirribonucleico complementario, se sintetiza a partir de una hebra simple de ARNm 31, 34
- AML
Anticuerpos antimúsculo liso 52
- APC
Adenomatous polyposis coli.....19, 21
- ARN
Ácido ribonucleico. 13, 29, 33, 34, 57, 58, 59, 60, 63, 69, 73, 79, 98, 99

B

- BRCA2
Breast Cancer Type 2 susceptibility protein 21
- BSP
Plataforma de muestras biológicas..... 29

C

- clusters
Uno o más genes encontrados en el ADN. 33

D

- DEL
Delección 62, 70, 78, 79
- DICER1**
Drosophila melanogaster 63
es un trastorno raro que hace que una persona tenga más tendencia a desarrollar determinados tipos de tumor19, 63, 70, 73, 79, 80, 81, 86, 87, 90

E

- EMA
Antígeno epitelial de membrana 52

G

- GLI1
Zinc finger protein 68, 69, 85, 86
- Glu
Glutamato 63, 80
- Gly
Glicina 63, 80

I

- IHQ
Análisis de inmunohistoquímica 52
- INMEGEN*
Instituto Nacional de Medicina Genómica. 2, 27, 51, 52
- INP
instituto Nacional de Pediatría..... 27
- INS
inserción..... 62, 70, 78, 79

LI

- LLA
Leucemia linfocítica aguda18, 42, 44, 75, 76, 95

M

- mosaicismo
Un individuo tiene dos o más poblaciones de células que difieren en su composición genética.....74, 81

N

- NaOH
Hidroxido de sodio.....33, 34
- NF1
Neurofibromatosis tipo 1 20, 22, 62, 63, 64, 79, 82, 86
- ng
Nanogramo 30, 32, 34, 56, 58
- Normalidad 34

O

OMIM

Herencia Mendeliana en el Hombre 19, 21, 84

OMS

Organizacion Mundial de la Salud.....9, 10, 17, 88

P

pb

Pares de base16, 30, 34, 56

PCR

Reacción en cadena de la polimerasa 16, 30, 33, 34

pM

Peso molecular 34

PMS2

Mismatch Repair Protein 22

primers

Es una cadena de ácido nucleico o de una molécula que sirve como punto de partida para la replicación del ADN..... 33

Es una cadena de ácido nucleico o de una molécula que sirve como punto de partida para la replicación del ADN..... 31

R

RB1

Retinoblastoma 121, 22

RIN

RNA INTEGRITY NUMBER 59, 60

RUNX1

Runt related transcription factor 122

S

SNC

Sistema Nervioso Cetral18, 37, 76

SNG

Next-Generation Sequencing.....17, 24

SNPs

Polimorfismos de un solo nucleótido 30

SNV

Variación de un solo nucleótido 62, 78, 79

T

TAC

Tomografía computarizada46

TBX5

T-box factor de transcripción 568

TP53

El gen TP53 proporciona instrucciones para preparar una proteína llamada proteína tumoral p53 (o p53).. 21, 67, 83, 84, 85, 86

M

µg

Microgramo..... 29, 32

µl

Microlitro29, 58, 98, 99, 100

Anexos

Anexo I Cuestionario

¿Cáncer infantil, indicación para el experto en genética clínica?

Si su paciente cumple uno o más de los criterios mencionados a continuación (uno o más círculos llenos), él o ella puede beneficiarse por un genétista clínico.

Nombre..... Fecha de nacimiento

1. Antecedentes familiares del niño con cáncer:

- ≥ 2 neoplasias malignas en la infancia (≤ 18 años de edad)
- Un familiar de primer grado (padre o hermano) con cáncer <45 años de edad
- ≥ 2 parientes de segundo grado con cáncer <45 años de edad en el mismo lado de la familia
- Los padres del niño con cáncer están relacionados, es decir, consanguíneos

2. Una persona con uno de estos tumores en la infancia:

- | | | |
|--|---|--|
| <input type="radio"/> Carcinoma adrenocortical | <input type="radio"/> LLA Hipodiploide | <input type="radio"/> Pineoblastoma |
| <input type="radio"/> Tumor teratoide rabdoide atípico | <input type="radio"/> Tumor maligno de la vaina del nervio periférico | <input type="radio"/> Retinoblastoma |
| <input type="radio"/> Gangliocitoma cerebeloso | <input type="radio"/> Carcinoma medular de tiroides | <input type="radio"/> Schwannoma (Neurilemoma) |
| <input type="radio"/> Carcinoma del plexo coroideo | <input type="radio"/> Meduloblastoma | <input type="radio"/> Tumor de células gigantes subependimales |
| <input type="radio"/> Tumores del saco endolinfático | <input type="radio"/> Glioma óptico | |
| <input type="radio"/> Hemangioblastoma | <input type="radio"/> Tumor de células de Sertoli-Leydig ovárico | |
| <input type="radio"/> Hepatoblastoma | <input type="radio"/> Blastoma pleuropulmonar | |
| <input type="radio"/> JMML | <input type="radio"/> Blastoma pituitario | |

Ó o Un cáncer en edad adulta, es decir, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, carcinoma basocelular, etc.

3. o Un niño con dos tumores malignos, uno de estos iniciado <18 años de edad (a menos que la 2ª neoplasia sea consistente en el tiempo y / o tipo de tejido con los esperados de su régimen de tratamiento).

4. o Un niño con cáncer y anomalías congénitas u otros síntomas específicos.

Signo

<i>Anomalías Congenitales</i>	Órganos, huesos, hendidura oral, dientes, ojos, oídos, cerebro, anomalías urogenitales, etc.
<i>Dismorfismos faciales</i>	
<i>Discapacidad intelectual</i>	
<i>Crecimiento aberrante</i>	Longitud, circunferencia de la cabeza, peso al nacer, crecimiento asimétrico
<i>Anomalías de la piel</i>	Pigmentación aberrante, es decir, > 2 manchas de café con leche, cambios en la piel vascular, hipersensibilidad a la luz solar, múltiples tumores benignos de la piel
<i>Trastornos hematológicos</i>	Pancitopenia, anemia, trombocitopenia, neutropenia
<i>Inmunodeficiencia</i>	

6. o Un niño con toxicidad excesiva por el tratamiento.

Anexo II Protocolos

EXTRACCIÓN DE DNA CON KIT PUREGENE

- 1.- Centrifugar la muestra a 3500 xg por 15 min
- 2.- Separar suero y buffy coat
- 3.- Colocar el buffy coat en un tubo corning de 15ml
- 4.- Añadir 8 ml de Sol. Buffer RBC, invertir el tubo para mezclar.
- 5.- Dejar reposar 30 min
- 6.- Centrifugar 3000 RPM por 15 min, decantar.
- 7.- Despegar el botón con vórtex.
- 8.- Agregar 2ml de Sol. Buffer RBC, centrifugar a 3000 xg por 10 min (opcional)
- 9.-Invertir el tubo para eliminar la mayor cantidad de eritrocitos posible y decantar.
- 10.-Despegar el botón con vórtex
- 11.-Agregar 3ml de sol. "Buffer de Lysis" y mezclar con vórtex
- 12.- Agregar 1ml de Precipitador de proteínas y mezclar bien con vórtex
- 13.- Centrifugar a 3000 xg por 10min

14.- En un tubo corning de 15ml nuevo agregar 3ml de isopropanol y añadir el sobrenadante del tubo que se acaba de centrifugar. Invertir para precipitar el DNA.

15.- Centrifugar a 3000 xg por 8 min. y decantar.

16.- Agregar 2ml de etanol al 70%, invertir varias veces el tubo hasta despegar el ADN del fondo del tubo.

17.- Centrifugar a 3000 xg por 8-10min, decantar y dejar secar el botón 15-30 min.

18.- Rehidratar con solución hidratante de ADN (200microlitros), colocar en un tubo de 1.5ml nuevo.

Aislamiento de ARN AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, cat. 80204)

Material:

- Tubos de 2 ml
- TissueRuptor (Qiagen, cat. 9001272)
- TissueRuptor Disposable Probes (Qiagen, cat.990890)
- Gradillas
- Guantes
- Centrifuga refrigerada a 20-25°C

- Antes de empezar se añade 10 µl β-mercaptoethanol (Sigma cat 63689) al Buffer RLT plus.

- Se agrega etanol absoluto (96-100%), al Buffer RPE, Buffer AW1 y Buffer AW2.

PROCEDIMIENTO

1. Se tomó un total de 30 mg de tejido
2. La muestra fue homogenizada en Buffer RLT con β -mercaptoetanol utilizando el TissueRuptor.
3. Se centrifugó el lisado por 3 min a máxima velocidad. Con cuidado se transfiere la columna AllPrep ADN a un tubo de 2 ml. Se centrifuga por 30 s a $\geq 8\ 000\ xg$ ($\geq 10\ 000$ rpm).
4. Se coloca la columna Allprep DNA en un nuevo tubo de 2ml dejándola a una temperatura de 15-25°C para después ser purificado.

PURIFICACIÓN DE ARN

1. Se añaden 600 μ l de etanol al 70% y se mezcla por pipeteo.
2. Se coloca la columna en un nuevo tubo de 2 ml y se transfiere 700 μ l de la muestra en la columna, se centrifuga durante 15 s a $\geq 8\ 000\ xg$ ($\geq 10\ 000$ rpm)
3. Se desecha el sobrante y se añaden 700 μ l Buffer RW1 a la columna y se centrifuga durante 15 s a $\geq 8\ 000\ xg$ ($\geq 10\ 000$ rpm).
4. Nuevamente se desecha el sobrante y se añaden 500 μ l de Buffer RPE a la columna RNeasy spin y se centrifuga por 15 s $\geq 8\ 000\ xg$ ($\geq 10\ 000$ rpm).
5. Se desecha el sobrante y se añade 500 μ l de Buffer RPE a la columna se centrifuga por 2 min $\geq 8\ 000\ xg$ ($\geq 10\ 000$ rpm).
6. Se colocó la columna en un nuevo tubo de 1.5 ml, se añaden 30-50 μ l Agua libre de RNAsas según el peso del tejido y centrifuga por 1 min, para la elución del ARN.

PURIFICACIÓN DE ADN

1. Se añaden 500 μ l Buffer AW1 a la columna AllPrep DNA, y se centrifuga por 15 s \geq 8 000 xg (\geq 10 000 rpm).
2. Se desecha el sobrante y se añadió 500 μ l Buffer AW2 a la columna y se centrifuga por 2 min \geq 8 000 xg (\geq 10 000 rpm).
3. Se coloca la columna en un nuevo tubo de 1.5 ml. Se añaden 100 μ l Buffer EB directamente a la columna incubando a una temperatura de 15-25°C por 1 min y posteriormente se centrifugó por 1 min \geq 8 000 xg (\geq 10 000 rpm).
4. Se repite el paso anterior.

REFERENCIAS

- (LSAC), L.-S. G. S. a. A. C. (2016, 07/06/2016). The cost of Sequencing A Human Genome.
- Anglesio, M. S., Wang, Y., Yang, W., Senz, J., Wan, A., Heravi-Moussavi, A., . . . Morin, G. B. (2013). Cancer-associated somatic DICER1 hotspot mutations cause defective miRNA processing and reverse-strand expression bias to predominantly mature 3p strands through loss of 5p strand cleavage. *J Pathol*, 229(3), 400-409. doi:10.1002/path.4135
- Ayhan, A., Salman, M. C., Velipasaoglu, M., Sakinci, M., & Yuce, K. (2009). Prognostic factors in adult granulosa cell tumors of the ovary: a retrospective analysis of 80 cases. *J Gynecol Oncol*, 20(3), 158-163. doi:10.3802/jgo.2009.20.3.158
- Ballester, R., Marchuk, D., Boguski, M., Saulino, A., Letcher, R., Wigler, M., & Collins, F. (1990). The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell*, 63(4), 851-859.
- Barbadilla, A. Genetica de Poblaciones. Retrieved from <http://bioinformatica.uab.es/base/base3.asp?sitio=geneticapoblaciones&anar=concep&item=mutacion>
- Barbieri, C. E., Bangma, C. H., Bjartell, A., Catto, J. W., Culig, Z., Gronberg, H., . . . Rubin, M. A. (2013). The mutational landscape of prostate cancer. *Eur Urol*, 64(4), 567-576. doi:10.1016/j.eururo.2013.05.029
- Bautista-Moreno, R. (2010). Las tres generaciones de la secuenciación. *Plataforma Andaluza de Bioinformática*, 3(128), 27-28.
- Botstein, D., & Risch, N. (2003). Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet*, 33 Suppl, 228-237. doi:10.1038/ng1090
- Bourdon, J. C. (2007). p53 and its isoforms in cancer. *Br J Cancer*, 97(3), 277-282. doi:10.1038/sj.bjc.6603886
- Boyd, K. P., Korf, B. R., & Theos, A. (2009). Neurofibromatosis type 1. *J Am Acad Dermatol*, 61(1), 1-14; quiz 15-16. doi:10.1016/j.jaad.2008.12.051
- Braveman, P., Egerter S Fau - Williams, D. R., & Williams, D. R. The social determinants of health: coming of age. (1545-2093 (Electronic)).
- Bridge, J. A., Swarts, S. J., Buresh, C., Nelson, M., Degenhardt, J. M., Spanier, S., . . . Neff, J. R. (1999). Trisomies 8 and 20 characterize a subgroup of benign fibrous lesions arising in both soft tissue and bone. *Am J Pathol*, 154(3), 729-733. doi:10.1016/S0002-9440(10)65319-9
- Brown, G. R., Hem, V., Katz, K. S., Ovetsky, M., Wallin, C., Ermolaeva, O., . . . Murphy, T. D. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. (1362-4962 (Electronic)). doi:D - NLM: PMC4383897 EDAT- 2014/10/31 06:00 MHDA- 2015/06/30 06:00 CRDT- 2014/10/31 06:00 AID - gku1055 [pii] AID - 10.1093/nar/gku1055 [doi] PST - ppublish
- Buermans, H. P., & den Dunnen, J. T. (2014). Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim Biophys Acta*, 1842(10), 1932-1941. doi:10.1016/j.bbadis.2014.06.015
- Bus, D., Buzogany, M., Nagy, G., & Vajda, G. (2017). Rare virilizing granulosa cell tumor in an adolescent. *Mol Clin Oncol*, 6(1), 88-90. doi:10.3892/mco.2016.1084
- Canales, J. (2014). Promoción de la salud. Retrieved from <http://www.slideshare.net/JoseMoi/promocion-de-la-salud-14056133>,
- Canfarotta, M., Riba-Wolman, R., Orsey, A. D., Balarezo, F., & Finck, C. (2016). DICER1 syndrome and thyroid disease. *Journal of Pediatric Surgery Case Reports*, 11, 31-34. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.epsc.2016.05.014>
- Cappione, A. J., French, B. L., & Skuse, G. R. (1997). A potential role for NF1 mRNA editing in the pathogenesis of NF1 tumors. *Am J Hum Genet*, 60(2), 305-312.
- Carpenter, R. L., & Lo, H. W. (2012). Hedgehog pathway and GLI1 isoforms in human cancer. *Discov Med*, 13(69), 105-113.

- CeNSIA. (2015, 20 Febrero 2015). Cáncer Infantil en México. Retrieved from http://censia.salud.gob.mx/contenidos/cancer/cancer_infantil.html
- Clayton, E. W. (2003). Ethical, legal, and social implications of genomic medicine. *N Engl J Med*, 349(6), 562-569. doi:10.1056/NEJMra012577
- Collins, F. S., Green, E. D., Guttmacher, A. E., Guyer, M. S., & Institute, U. S. N. H. G. R. (2003). A vision for the future of genomics research. *Nature*, 422(6934), 835-847. doi:10.1038/nature01626
- Dodd, R. D., Mito, J. K., Eward, W. C., Chitalia, R., Sachdeva, M., Ma, Y., . . . Kirsch, D. G. (2013). NF1 deletion generates multiple subtypes of soft-tissue sarcoma that respond to MEK inhibition. *Mol Cancer Ther*, 12(9), 1906-1917. doi:10.1158/1535-7163.MCT-13-0189
- Doros, L., Schultz, K. A., Stewart, D. R., Bauer, A. J., Williams, G., Rossi, C. T., . . . Hill, D. A. (1993). DICER1-Related Disorders. In R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger, S. E. Wallace, A. Amemiya, L. J. H. Bean, T. D. Bird, N. Ledbetter, H. C. Mefford, R. J. H. Smith, & K. Stephens (Eds.), *GeneReviews*(R). Seattle (WA).
- Epstein, C. J. (2006). Medical genetics in the genomic medicine of the 21st century. *Am J Hum Genet*, 79(3), 434-438. doi:10.1086/507610
- Estrategia de promoción de salud y prevención en el SNS*. (NIPO: 680-14-018-4). (2014). Madrid: Ministerio de Sanidad, servicios sociales e igualdad. Centro de Publicaciones Retrieved from <https://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/Estrategia/docs/EstrategiaPromocionSaludyPrevencionSNS.pdf>.
- Ferreiro, J. G., J.L.; Barcelo R.; Rubio, I. (2003). Quimioterapia: efectos secundarios. *Gac Med Bilbao*(100), 69-74.
- Ferris-Tortajada, J., Ortega-García, J. A., Marco-Macian, A., & Garcia-Castell, J. (2004). Medio ambiente y cáncer pediátrico. *An Pediatr*, 61(1), 42-50. doi:10.1016/S1695-4033(04)78352-6
- Fisher, S., Barry, A., Abreu, J., Minie, B., Nolan, J., Delorey, T. M., . . . Nusbaum, C. (2011). A scalable, fully automated process for construction of sequence-ready human exome targeted capture libraries. *Genome Biol*, 12(1), R1. doi:10.1186/gb-2011-12-1-r1
- Forbes, S., Clements J Fau - Dawson, E., Dawson E Fau - Bamford, S., Bamford S Fau - Webb, T., Webb T Fau - Dogan, A., Dogan A Fau - Flanagan, A., . . . Stratton, M. R. COSMIC 2005. (0007-0920 (Print)). doi:D - NLM: PMC2361125 EDAT- 2006/01/20 09:00 MHDA- 2006/03/15 09:00 CRDT- 2006/01/20 09:00 AID - 6602928 [pii] AID - 10.1038/sj.bjc.6602928 [doi] PST - ppublish
- Genetica, D. d. (2011). Variacion en el ADN: polimorfismos y mutaciones. Retrieved from <http://www.unav.es/ocw/genetica/tema3-1.html>
- Gibbon, S. (2011). Family medicine, 'La Herencia' and breast cancer; understanding the (dis)continuities of predictive genetics in Cuba. *Social Science & Medicine* (1982), 72(11), 1784-1792. doi:10.1016/j.socscimed.2010.09.053
- Gonzaga-Jauregui, C., Lupski Jr Fau - Gibbs, R. A., & Gibbs, R. A. Human genome sequencing in health and disease. (1545-326X (Electronic)). doi:D - NLM: NIHMS460946
- D - NLM: PMC3656720 EDAT- 2012/01/18 06:00 MHDA- 2012/05/16 06:00 CRDT- 2012/01/18 06:00 AID - 10.1146/annurev-med-051010-162644 [doi] PST - ppublish
- Gulledge, A. A., Roberts, A. D., Vora, H., Patel, K., & Loraine, A. E. (2012). Mining Arabidopsis thaliana RNA-seq data with Integrated Genome Browser reveals stress-induced alternative splicing of the putative splicing regulator SR45a. *Am J Bot*, 99(2), 219-231. doi:10.3732/ajb.1100355
- Gupta, S., Rivera-Luna, R., Ribeiro, R. C., & Howard, S. C. (2014). Pediatric Oncology as the Next Global Child Health Priority: The Need for National Childhood Cancer Strategies in Low- and Middle-Income Countries. *PLOS Medicine*, 11(6), e1001656. doi:10.1371/journal.pmed.1001656
- Guttmacher, A. E., & Collins, F. S. (2002). Genomic medicine--a primer. *N Engl J Med*, 347(19), 1512-1520. doi:10.1056/NEJMra012240

- Harismendy, O., Ng, P. C., Strausberg, R. L., Wang, X., Stockwell, T. B., Beeson, K. Y., . . . Frazer, K. A. (2009). Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. *Genome Biol*, *10*(3), R32. doi:10.1186/gb-2009-10-3-r32
- Hernandez-Boussard, T., Rodriguez-Tome, P., Montesano, R., & Hainaut, P. (1999). IARC p53 mutation database: A relational database to compile and analyze p53 mutations in human tumors and cell lines. *Hum. Mutat*, *14*, 1-8. doi:10.1002/(SICI)1098-1004(1999)14:1<1::AID-HUMU1>3.0.CO;2-H
- Hill, R. M., Kuijper, S., Lindsey, J. C., Petrie, K., Schwalbe, E. C., Barker, K., . . . Clifford, S. C. (2015). Combined MYC and P53 defects emerge at medulloblastoma relapse and define rapidly progressive, therapeutically targetable disease. *Cancer Cell*, *27*(1), 72-84. doi:10.1016/j.ccell.2014.11.002
- Institute, N. H. G. R. (2010, October 30 2010). The Human Genome Project Completion. Retrieved from <https://www.genome.gov/11006943/>
- Jones, A., Teschendorff, A. E., Li, Q., Hayward, J. D., Kannan, A., Mould, T., . . . Widschwendter, M. (2013). Role of DNA methylation and epigenetic silencing of HAND2 in endometrial cancer development. *PLoS Med*, *10*(11), e1001551. doi:10.1371/journal.pmed.1001551
- Jongmans, M. C. J., Loeffen, J. L. C. M., Waanders, E., Hoogerbrugge, P. M., Ligtenberg, M. J. L., Kuiper, R. P., & Hoogerbrugge, N. (2016). Recognition of genetic predisposition in pediatric cancer patients: An easy-to-use selection tool. *European Journal of Medical Genetics*, *59*(3), 116-125. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2016.01.008>
- Joshi, P. S., Deshmukh, V., & Golgire, S. (2012). Gorlin-Goltz syndrome. *Dent Res J (Isfahan)*, *9*(1), 100-106. doi:10.4103/1735-3327.92963
- Klopocki, E., & Mundlos, S. (2011). Copy-number variations, noncoding sequences, and human phenotypes. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, *12*, 53-72. doi:10.1146/annurev-genom-082410-101404
- Kottarathil, V. D., Antony, M. A., Nair, I. R., & Pavithran, K. (2013). Recent advances in granulosa cell tumor ovary: a review. *Indian J Surg Oncol*, *4*(1), 37-47. doi:10.1007/s13193-012-0201-z
- Kouzak, S. S., Mendes, M. S. T., & Costa, I. M. C. (2013). Cutaneous mosaicisms: concepts, patterns and classifications. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, *88*, 507-517.
- Kuri-Morales, P. (2011). La transición en salud y su impacto en la demanda de servicios. *Gac Med Mex*, *6*(147), 451-454.
- Lee, H. Y., & Ahmed, Q. (2003). Fibrosarcoma of the ovary arising in a fibrothecomatous tumor with minor sex cord elements. A Case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med*, *127*(1), 81-84. doi:10.1043/0003-9985(2003)127<81:FOTOAI>2.0.CO;2
- Li, Y., Chen, J., Zhang, J., Wang, Z., Shao, T., Jiang, C., . . . Li, X. (2015). Construction and analysis of lncRNA-lncRNA synergistic networks to reveal clinically relevant lncRNAs in cancer. *Oncotarget*, *6*(28), 25003-25016. doi:10.18632/oncotarget.4660
- Lister, R., Gregory, B. D., & Ecker, J. R. (2009). Next is now: new technologies for sequencing of genomes, transcriptomes, and beyond. *Curr Opin Plant Biol*, *12*(2), 107-118. doi:10.1016/j.pbi.2008.11.004
- Medicine, M.-N. I. o. G. (2017). OMIM Online Mendelian Inheritance in Man. . from Johns Hopkins University <https://omim.org/>
- Medrano-Hernández, A. M. (2012). Medicina personalizada:hacia un nuevo modelo en la práctica médica. *Arch Neurocién*, *17*(2), 129-131.
- Miano, J. M. (2015). Myocardin in biology and disease. *J Biomed Res*, *29*(1), 3-19. doi:10.7555/JBR.29.20140151
- Narod, S. A., Stiller, C., & Lenoir, G. M. (1991). An estimate of the heritable fraction of childhood cancer. *British Journal of Cancer*, *63*(6), 993-999.
- Navajas, A., & Peris, R. (2007). Tumores en la infancia: consideraciones epidemiológicas y terapéuticas. *JANO*(1668), 29-37.
- Ortega-García, J. A. L. H., F.A.; Sobrino-Najul, E; Febo, I; Fuster-Soler, J.L. (2003). Medio ambiente y cáncer pediátrico en la Región de Murcia (España): integrando la historia clínica

- medioambiental en un sistema de información geográfica. *Anales de Pediatría*, 74(4), 255-260. doi:10.1016/j.anpedi.2010.11.005
- Osorio-Solache, O. (2014). Promoción de la Salud. Retrieved from <http://www.promocion.salud.gob.mx/dgps/interior1/promocion.html>
- Planificación Local Participativa. Metodologías para la Promoción de la Salud en América Latina y el Caribe.* (1999). Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud.
- PRAT, J., & SCULLY, R. E. (1982). Cellular Fibromas and Fibrosarcomas of the Ovary: A Comparative Clinicopathologic Analysis of Seventeen Cases. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 37(6), 429-432.
- Ramírez, A. (2012). Cáncer Infantil a nivel mundial. Retrieved from <http://censia.salud.gob.mx/contenidos/cancer/nivelmundial.html>
- Ramsay, G., Evan, G. I., & Bishop, J. M. (1984). The protein encoded by the human proto-oncogene *c-myc*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(24), 7742-7746.
- Ratner, N., & Miller, S. J. (2015). A RASopathy gene commonly mutated in cancer: the neurofibromatosis type 1 tumour suppressor. *Nat Rev Cancer*, 15(5), 290-301. doi:10.1038/nrc3911
- Rio Frio, T., Bahubeshi, A., Kanellopoulou, C., Hamel, N., Niedziela, M., Sabbaghian, N., . . . Tischkowitz, M. (2011). DICER1 mutations in familial multinodular goiter with and without ovarian Sertoli-Leydig cell tumors. *Jama*, 305(1), 68-77. doi:10.1001/jama.2010.1910
- Rivera-Luna, R. C.-C., R; Olaya-Vargas, A; Shalkow-Klinovstein, J; Pérez-García, M; Pérez-González, OA;; Díaz-Jiménez, V; Amador-Zarco, JJ; Melchor, VY. (2015). El niño de población abierta con cáncer en México. Consideraciones epidemiológica. *An Med Asoc Med Hosp ABC*, 60(2), 91-97.
- Robbins, D. J., Fei, D. L., & Riobo, N. A. (2012). The Hedgehog signal transduction network. *Sci Signal*, 5(246), re6. doi:10.1126/scisignal.2002906
- Robles, L., Balmaña, J., Barrel, I., Grandes, S., Graña, B., Guillén, C., . . . Sánchez, J. (2013). Consenso en cáncer hereditario entre la Sociedad Española de Oncología Médica y las sociedades de atención primaria. *SEMERGEN - Medicina de familia*, 39(5), 259-266. doi:10.1016/j.semerg.2012.08.007
- Robson, M. E., Storm, C. D., Weitzel, J., Wollins, D. S., Offit, K., & American Society of Clinical, O. (2010). American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic and genomic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol*, 28(5), 893-901. doi:10.1200/JCO.2009.27.0660
- Rodríguez, A. L. P. C., N. M., Kuttothara, A. J.; Serrano, A. (2009). Tumor de células de la granulosa. Factores de pronóstico adverso en un tumor infrecuente del ovario. *Anales Médicos*, 54(2), 109-113.
- Rodríguez-Santiago, B., & Armengol, L. (2012). Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnóstico Prenatal*, 23(2), 56-66. doi:10.1016/j.diapre.2012.02.001
- Schuijjer, M., & Berns, E. M. (2003). TP53 and ovarian cancer. *Hum Mutat*, 21(3), 285-291. doi:10.1002/humu.10181
- Schultz, K. A., Yang, J., Doros, L., Williams, G. M., Harris, A., Stewart, D. R., . . . Hill, D. A. (2014). DICER1-pleuropulmonary blastoma familial tumor predisposition syndrome: a unique constellation of neoplastic conditions. *Pathol Case Rev*, 19(2), 90-100. doi:10.1097/pcr.000000000000027
- Screening, T. N. Y.-M.-A. C. f. G. a. N. (2009). Reconstrucción del árbol genealógico y de los antecedentes familiares *Cómo entender la gnética: Una Guía para pacientes y profesionales médicos en la región de Nueva York y el Atlántico Medio.* Washington (DC): Genetic Alliance.
- Silva-Zolezzi, I., Hidalgo-Miranda, A., Estrada-Gil, J., Fernandez-Lopez, J. C., Uribe-Figueroa, L., Contreras, A., . . . Jimenez-Sanchez, G. (2009). Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(21), 8611-8616. doi:10.1073/pnas.0903045106

- Sonia Santillán-Garzón, S., Diego-Álvarez, D., Buades, C., Romera-López, A., Pérez-Cabornero, L., Valero-Hervás, D., . . . Ballester, A. (2015). DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ENFERMEDADES GENÉTICAS: DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO AL DIAGNÓSTICO GENÓMICO CON LA SECUENCIACIÓN MASIVA. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(4), 458-469. doi:10.1016/j.rmcl.2015.07.004
- Soto Sedano, J. C., & Lopez Carrascal, C. E. (2012). RNA-seq herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad*, 16(2), 101-113.
- Steliarova-Foucher, E., Colombet, M., Ries, L., Hesselting, P., Moreno, F., Shin, H., & Stiller, C. (2017). *International Incidence of Childhood Cancer, Volume III (electronic version)*. Retrieved from Lyon, France: <http://iicc.iarc.fr/results/>
- Stenson, P. D., Ball, E. V., Howells, K., Phillips, A. D., Mort, M., & Cooper, D. N. (2009). The Human Gene Mutation Database: providing a comprehensive central mutation database for molecular diagnostics and personalized genomics. *Hum Genomics*, 4(2), 69-72.
- Szychot, E., Apps, J., & Pritchard-Jones, K. (2014). Wilms' tumor: biology, diagnosis and treatment. *Translational Pediatrics*, 3(1), 12-24. doi:10.3978/j.issn.2224-4336.2014.01.09
- team, T. A. C. S. m. a. e. c. (2016). Key statistics for childhood cancer.
- Torres, V., & Soares, M. (2015). Pacientes com neoplasias hematológicas internados nas unidades de terapia intensiva: novos desafios para o intensivista. *Rev Bras Ter Intensiva*, 27(3), 193-195.
- Tortajada, J. F., i Castell, J. G., Andreu, J. L., & Porres, C. P. . (1999). Factores genéticos asociados a cánceres pediátricos. *An Esp Pediatr*, 50, 4-13.
- Trovo-Marqui, A. B., & Tajara, E. H. (2006). Neurofibromin: a general outlook. *Clin Genet*, 70(1), 1-13. doi:10.1111/j.1399-0004.2006.00639.x
- Tsuji, T., Kawachi, S., Utsunomiya, T., Nagata, Y., & Tsuneyoshi, M. (1997). Fibrosarcoma versus cellular fibroma of the ovary: a comparative study of their proliferative activity and chromosome aberrations using MIB-1 immunostaining, DNA flow cytometry, and fluorescence in situ hybridization. *Am J Surg Pathol*, 21(1), 52-59.
- Ulitsky, I., & Bartel, D. P. (2013). lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell*, 154(1), 26-46. doi:10.1016/j.cell.2013.06.020
- Valdespino-Gómez, V. M., & Valdespino-Castillo, V. E. (2016). Utilidad de la consulta oncogenética molecular en individuos adultos con cáncer familiar. 2016, 54(3), 11.
- Wang, Y., Chen, J., Yang, W., Mo, F., Senz, J., Yap, D., . . . Huntsman, D. G. (2015). The oncogenic roles of DICER1 RNase IIIb domain mutations in ovarian Sertoli-Leydig cell tumors. *Neoplasia*, 17(8), 650-660. doi:10.1016/j.neo.2015.08.003
- WHO. (1986). *The Ottawa Charter for Health Promotion*. Retrieved from <http://www.who.int/healthpromotion/conferences/previous/ottawa/en/>
- Wu, T., & Donohoe, M. E. (2015). The converging roles of BRD4 and gene transcription in pluripotency and oncogenesis. *RNA Dis*, 2(3).
- Yu, J., Ma, X., Cheung, K. F., Li, X., Tian, L., Wang, S., . . . Sung, J. J. (2010). Epigenetic inactivation of T-box transcription factor 5, a novel tumor suppressor gene, is associated with colon cancer. *Oncogene*, 29(49), 6464-6474. doi:10.1038/onc.2010.370
- Zhang, J., Walsh, M. F., Wu, G., Edmonson, M. N., Gruber, T. A., Easton, J., . . . Downing, J. R. (2015). Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer. *New England Journal of Medicine*, 373(24), 2336-2346. doi:doi:10.1056/NEJMoa1508054
- Zong, L., Lin, M., & Fan, X. (2014). Mitotically active cellular fibroma of ovary should be differentiated from fibrosarcoma: a case report and review of literature. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(11), 7578-7582.

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

*Agradecimiento a la UACM por el apoyo económico brindado
para la impresión y empastado del trabajo recepcional.*