



Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal

Tesis doctoral

**Variantes genéticas implicadas en la susceptibilidad del
osteosarcoma pediátrico**

Nerea Bilbao Aldaiturriaga

Leioa, 2015

Si piensas que puedes, tú puedes. Y si piensas que no puedes, estás en lo cierto.

Mary Kay Ash

Agradecimientos

Siempre he oído que “es de bien nacido ser agradecido” y es por ello que quiero agradecer a todas aquellas personas que de una forma u otra me han ayudado a realizar este trabajo.

En primer lugar, quiero agradecer a mis dos directoras de tesis, Dra. África García-Orad y la Dra. Idoia Martin Guerrero no solo por todo lo que me habéis ayudado en el plano personal y profesional sino también por todo vuestro ánimo y dedicación. Os agradezco enormemente todo el tiempo y recursos que habéis puesto a mi alcance para seguir adelante.

A mi super familia del labo!! En especial a Ángela que has estado conmigo desde el primer día. Tu has creído mucho más en mí que yo misma y siempre me lo has recordado en el banco tomando café. Muchas gracias por ser la perfecta compañera, por todos esos momentos de risa, de no tan risa, de lloros y por todo, todo y todo tu apoyo, sin el que hubiera sido imposible que hubiera seguido. Idoia, que además de ser mi codirectora, has sido la persona que más me ha enseñado y te has preocupado de que aprenda. Me has enseñado lo importante que es el buen hacer y a relativizar. Has sido mi ejemplo de profesional sin perder calidad humana. Realmente valoro que hayas sido tú quien haya estado a mi lado y precisamente tu has sido una de las razones por las que he seguido con este proyecto a pesar de las dificultades. Como ya sabes, esta tesis es tan tuya como mía. Eskerrik asko benetan! Aiixx lo que os voy a echar de menos!! Muchas muchas gracias a mi María!! Mi super coach de ánimos!! Muchas gracias por estar conmigo, animarme como si fuera Indurain en su último repecho cuando hacía una simple presentación. Muchas gracias por tu calidad humana, por tu generosidad y por ser tan mona y elegante!! Por favor, el blog de moda!! Eli!!! De ti no me olvido!! Muchas gracias por estar ahí detrás en los comienzos y no tan comienzos!! Muchas gracias por darme la oportunidad de aprender. Eres un gran referente y no lo dudo!! Tampoco quiero olvidarme de todas esas personas que han sido mis dobles y triples ojos que han ayudado en esta tesis María López, Alba, Itsasne, Ziortza, Ander, María Constantin.

Amaia Jauregi handiari eskerrik beroenak, beti animo hitzak eta hitz zintzoak euki dozuzalako eta zu bezalako pertsonarik ez dagoelako, benetan, ez aldatu inoiz!!! Irati, zuri ere eskerrik asko zure konfidantza emon zenidalako lehenengo egunetik, nire bizitzako proiektu oso garrantzitsu batean. Eskerrik asko zuen afarrietan, trikipoteoetan, karaokean, en fin zuekin egoteko aukerak emoteagatik. Nola ez, eskerrik asko Leticia, Nora, Izortze, Koldo eta Buli

laborategiari bizitasune emoten dotsezuelako eta niri aholku zein laguntza eskaintzearren. Piloa estimatuot, eskerrik asko!!!

Eskerrik asko nire Mary Kay familiari, bereziki Maidertxuri. Maider, eskerrik asko nire ametsak egia bihurtzeko proiektua erakusteagatik. Eskerrik asko astelehenero zure animo hitzek nire buruhaustek burutik kendu eta etxera barre batekin joatea lortu duzulako bi urte terdi hauetan. Eskerrik asko por enseñarme a pensar en grande!!! Ezin dodaz ahaztu nire Sarandongaaaak!!! Eskerrik asko por intentar entenderme y por la fuerza que me dan vuestras palabras!

A toda la gente de la piscina!!! Jose Ignacio, Teresita, Patricia, Belén, Iciar, Gloria que me habéis visto crecer brazada tras brazada!! Por fin he terminado!!!!

Nire kuadrillari asko eskertu behar dotset beti hor egoteagatik. Zenbat jai, opor eta zenbat kalimotxo!! Askok, asko eta asko lagundu izan dostezue nire bajoi momentuetan zutuntzen lagundu didazuelako, nahiz eta askotan ez dozuen jakin. Eskerrik asko nire auzora etorteagatik nik zerbezatzu bet edateko eta beti plan bat eukitzea ahalbidetu dozuelako. Aupa K87!!!!Eskerrik asko familia!!

A toda mi familia, en especial a Aita y a Ama que me habéis cuidado, apoyado y aguantado aunque muchas veces no me hayais entendido. De verdad muchas gracias. A mi hermana y a mi cuñado por acogerme en vuestra casa y hacerme reir y sobre todo por tener a Anne!!! A mi tia preferida Lurdes, porque todos los viernes me preguntaba qué tal iba la tesis y no sabía cómo responderle!! A mi prima preferida, Anita, por creer muchísimo en mi, por escucharme en mi malos momentos. Eskerrik asko de verdad. Arantzi eta Josu, zuei ere eskerrik asko zuen etxean orduak eta orduak egon nazelako eta nire etxean banengo moduan sentiarazi izan nozuelako. Eskerrik asko benetan zuen laguntza, animo zintzoak eta ni entzuteagatik Mila esker!!!

Ta azkenik, zuri, Aitzol. Eskerrik asko nire alboan egoteagatik momentu onetan eta batez ere momentu txarretan. Eskerrik asko ni zaintzeagatik eta behar izan dodanean, nire eskuak ordenagailutik kendu eta kalera joateko behartzeagatik. Eskerrik asko nire alderik onena atera duzulako momentu latzenetan.

Publicaciones

El trabajo de esta tesis ha sido reflejado en las siguientes publicaciones:

Bilbao-Aldaiturriaga N, Martin-Guerrero I, Garcia-Orad A. "Research commentary regarding Savage et al entitled "Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for osteosarcoma"". (Enviado a Tumor Biology IF:3.611 Oncology Q2 68/211).

Bilbao-Aldaiturriaga N, Askaiturrieta Z, Granado-Tajada I, Goričar K, Dolžan V for the Slovenian Osteosarcoma Study Group, Garcia-Miguel P, Garcia de Andoin N, Martin-Guerrero I* and Garcia-Orad A*. An updated systematic review and meta-analysis of MDM2 polymorphisms in osteosarcoma susceptibility. (Enviado Critical reviews in Oncology and Hematology Q2 Oncology 51/202 IF: 4.046)

Bilbao-Aldaiturriaga N, Gutiérrez-Camino A, Martin-Guerrero I, Pombar-Gómez M, Zalacain-Díez M, Patiño-García A, López-López E, Garcia-Orad A. Polymorphisms in miRNA processing genes and their role in osteosarcoma risk. *Pediatr Blood Cancer*. 2015 May;62(5):766-9 (Pediatrics Q1 27/122 IF: 2.353)

Bilbao-Aldaiturriaga N, Martin-Guerrero I, García-Orad A. Re: Letter regarding Wang et al., entitled "Effects of murine double minute 2 polymorphisms on the risk and survival of osteosarcoma: a systematic review and meta-analysis". *Tumour Biol*. 2014 Jul;35(7):6179 (Oncology T2 102/197 IF: 2.51).

Bilbao Aldaiturriaga, N, Martin-Guerrero, I, Lopez-Lopez E, Gutierrez-Camino A, García-Orad Carles, A. miRNA en prozesamendu geneen aldakortasun genetikoa osteosarkoman. *Ikergazte*. 808-815.

Bilbao Aldaiturriaga, N, Martin-Guerrero, I, García-Orad Carles, A. Meta-analisisen erabilgarritasunaren analisi kritikoa. *Ekaia*. Volumen 27. ISSN: 0214-9001.

Durante esta tesis también participé en las siguientes publicaciones:

Bilbao Aldaiturriaga, N, Askaiturrieta Ostolaza, Z, Callado Hernando, K, García-Orad Carles, A. Farmakogenetika, etorkizuneko medikuntza pertsonalizatua. *Elhuyar*. Volumen X. ISSN: 0212-1735.

Martin-Guerrero I, Gutiérrez-Camino A, Lopez-Lopez E, **Bilbao-Aldaiturriaga N**, Pombar-Gómez M, Ardanaz M, Garcia-Orad A. Genetic variants in microRNA processing genes and pre-miRNAs are associated with the risk of Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLoS One*. 2015 Mar 20;10(3):e0118905. (Multidisciplinary Sciences Q1 8/55 IF: 3.534).

Lopez-Lopez E; Gutierrez-Camino A; **Bilbao-Aldaiturriaga N**; Pombar-Gómez M; Martin-Guerrero I; Garcia-Orad A. Pharmacogenetics of childhood acute lymphoblastic leukemia.

Pharmacogenomics. 2014 Jul;15(10):1383-98 (Pharmacology & Pharmacy Q1 47/261 IF: 3.857).

Abreviaturas

3UTR	Región 3' no traducida del gen
5UTR	Región 5' no traducida del gen
95%IC	Intervalo de confianza del 95%
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ala	Alanina
<i>AP1</i>	<i>Gen activator protein 1 transcription factor</i>
<i>ARID5B</i>	<i>Gen AT rich interactive domain 5B</i>
ARMS-PCR	PCR alelo específica
ASO	Oligonucleótido alelo específico
BIB	Bibliográfico
<i>BMP2</i>	<i>Gen bone morphogenetic protein 2</i>
<i>C9orf3</i>	<i>Gen chromosome 9 open reading frame 3</i>
<i>CASP3</i>	<i>Gen caspase 3,</i>
<i>CCNE1</i>	<i>Gen cyclin E1</i>
<i>CDK4</i>	<i>Gen cyclin-dependent kinase 4</i>
<i>CEBPE</i>	<i>Gen CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), epsilon</i>
CeGen-ISCI	Centro Nacional de Genotipado
CGH	Hibridación genómica comparada
c-MET	<i>Gen MET proto-oncogene,</i>
CMM	Células madre mesenquimales
<i>CNOT1</i>	<i>Gen CCR4-NOT transcription complex, subunit 1</i>
<i>CNOT2</i>	<i>Gen CCR4-NOT transcription complex, subunit 2</i>
<i>CNOT3</i>	<i>Gen CCR4-NOT transcription complex, subunit 3</i>
<i>CNOT4</i>	<i>Gen CCR4-NOT transcription complex, subunit 4</i>
<i>CNOT5</i>	<i>Gen CCR4-NOT transcription complex, subunit 5</i>
<i>CNOT6</i>	<i>Gen CCR4-NOT transcription complex, subunit 6</i>
CNV	Variaciones en número de copia
cod	Codominante
<i>COL1A1</i>	<i>Gen collagen, type I, alpha 1</i>
<i>CSMD3</i>	<i>Gen CUB and Sushi multiple domains 3</i>
<i>CTLA4</i>	<i>Gen cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
<i>DDX17</i>	<i>Gen DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 17</i>
DGCR8	<i>Gen DGCR8 microprocessor complex subunit</i>
DGV	<i>Database of Genomic Variation</i>
<i>DICER</i>	<i>Gen dicer 1, ribonuclease type III</i>
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
dom	Dominante
<i>DROSHA</i>	<i>Gen drosha, ribonuclease type III</i>
dsRNA	ARN de doble cadena
DTT	Ditiotreitol
<i>E2F1</i>	<i>Gen E2F transcription factor 1</i>
EDTA	Ácido etilen-diaminotetraacético

EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
<i>EIF2C1</i>	Gen <i>eukaryotic translation initiation factor 2C, 1</i>
<i>EIF2C2</i>	Gen <i>eukaryotic translation initiation factor 2C, 2</i>
ENCODE	Enciclopedia de elementos del ADN
F	Forward
FDR	False Discovery Rate
<i>GEMIN3</i>	Gen <i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 20</i>
<i>GEMIN4</i>	Gen <i>gem (nuclear organelle) associated protein 4</i>
<i>GEMIN5</i>	Gen <i>gem (nuclear organelle) associated protein 5</i>
<i>GH1</i>	Gen <i>growth hormone 1</i>
<i>GRM4</i>	Gen <i>glutamate receptor, metabotropic 4</i>
GWAS	Estudio de asociación de genoma completo
H ₂ O	Agua
<i>HIWI</i>	Gen <i>piwi-like RNA-mediated gene silencing 1</i>
<i>IGF1</i>	Gen <i>insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)</i>
<i>IGF2R</i>	Gen <i>insulin-like growth factor 2 receptor</i>
<i>IKZF1</i>	Gen <i>IKAROS family zinc finger 1</i>
Ile	Isoleucina
ISCI	Instituto de Salud Carlos III
<i>JUND</i>	Proto-oncogen <i>jun D</i>
log	Log-aditivo
LOH	Pérdida de heterocigosidad
<i>LSAMP</i>	Gen <i>limbic system-associated membrane protein</i>
LSO	Oligonucleótido locus específico
LLA	Leucemia linfoblástica aguda infantil
M	Maduro
MA	Meta-análisis
MAF	Frecuencia del alelo menor
<i>MDM2</i>	Gen <i>MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase</i>
MgCl ₂	Cloruro magnésico
miRISC	Complejo RISC junto con miRNA
miRNAs	MicroRNAs
miR-SNPs	SNPs en pre-miRNAs/miRNAs
MIRTS	Diana de miRNA
mRNA	ARN mensajero
<i>MYC</i>	Gen <i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NaCl	Cloruro sódico
<i>NBN</i>	Gen <i>nibrin</i>
ncRNA	ARN no codificante
ND	No disponible
NGS	Secuenciación masiva
<i>NPNT</i>	Gen <i>nfronectin</i>
NS	No sinónimo
OD260	Absorbancia a 260 nm
OD280	Absorbancia a 280 nm
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Odds ratio
OS	Osteosarcoma
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción-PCR
PE	Presente estudio

<i>PIWIL1</i>	Gen <i>piwi-like RNA-mediated gene silencing 1</i>
PM	Pre-maduro
pRB	Proteína del retinoblastoma
PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses</i>
<i>PTBP1</i>	Gen <i>polypyrimidine tract binding protein 1</i>
<i>PTEN</i>	Gen <i>phosphatase and tensin homolog</i>
R	Reverse
RAN	Gen <i>RAN, member RAS oncogene family</i>
<i>RB1</i>	Gen <i>retinoblastoma 1</i>
rec	Recesivo
<i>RECQL4</i>	Gen <i>RecQ protein-like 4</i>
Ref	Referencia
RISC	Complejo <i>RNA-inducing silencing</i>
RNTI	Registro Nacional de Tumores Infantiles
<i>RUNX2</i>	Gen <i>runt-related transcription factor 2</i>
sd	Desviación estandar
<i>SF1</i>	Gen <i>splicing factor 1</i>
SGIKER	Servicios Generales de Investigación
<i>SMAD5</i>	Gen <i>SMAD family member 5</i>
<i>SND1</i>	Gen <i>staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1</i>
SNP	Polimorfismos de un solo nucleotido
SP	Sangre periférica
Sp1	Factor de transcripción Sp1
SR	Regulación <i>splicing</i>
<i>TARBP2</i>	Gen <i>TAR (HIV-1) RNA binding protein 2</i>
TBE	Solución Tris/Borato/EDTA
<i>TGFBR1</i>	Gen <i>transforming growth factor, beta receptor 1</i>
Thr	Treonina
<i>TNRC6A</i>	Gen <i>trinucleotide repeat containing 6A</i>
<i>TNRC6B</i>	Gen <i>trinucleotide repeat containing 6B</i>
<i>TP53</i>	Gen <i>tumor protein p53</i>
<i>TRAF6</i>	Gen <i>TNF receptor associated factor 6</i>
Tris	Solución Tris(hidroximetil)aminometano
UR	Regulación aguasarriba
Val	Valina
<i>VEGFA</i>	Gen <i>vascular endothelial growth factor A</i>
<i>XPO5</i>	Gen <i>exportin 5</i>

Indice

<i>INTRODUCCIÓN</i>	<i>27</i>
OSTEOSARCOMA	29
Definición	29
Epidemiología	29
Factores pronósticos y tratamiento	30
Características del tumor	30
Características histopatológicas	31
Características genéticas	31
Etiología	32
Susceptibilidad genética del Osteosarcoma	34
Estudios de genes candidato	36
Estudios de genoma completo	41
REGIONES NO CODIFICANTES	42
miRNAs	42
Genes de procesamiento de miRNAs y cáncer	47
miRNAs y cáncer	48
ANEXO	51
<i>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</i>	<i>79</i>
HIPÓTESIS	81
OBJETIVOS	83
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	<i>85</i>
POBLACIÓN DE ESTUDIO	87
SNPS PREVIAMENTE ASOCIADOS A LA SUSCEPTIBILIDAD DEL OS	89

Búsqueda de genes asociados a la susceptibilidad del OS.....	89
Genotipado del SNP rs1690916 en el gen <i>MDM2</i>	89
Genotipado del SNP rs2279744 en el gen <i>MDM2</i>	92
Meta-análisis de los SNPs rs1690916 y rs2279744 en el gen <i>MDM2</i>	94
Genotipado del SNP rs231775 en el gen <i>CTLA4</i>	98
Meta-análisis del SNP rs231775 en el gen <i>CTLA4</i>	99
SNPS EN GENES RELACIONADOS CON LOS MIRNAS.....	100
Búsqueda de miRNAs desregulados en la susceptibilidad del OS.....	100
SNPs en genes de procesamiento de miRNAs	101
Selección de SNPs en genes de procesamiento de miRNAs.....	101
Genotipado de SNPs en genes de procesamiento de miRNAs.....	103
SNPs en miRNAs	105
Selección de SNPs en miRNAs	105
Genotipado de SNPs en miRNAs	106
Análisis <i>in silico</i> de estructura secundaria de miRNAs	107
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	107
ANEXO	109
<u>RESULTADOS</u>	<u>125</u>
VALIDACIÓN DE SNPS ASOCIADOS A LA SUSCEPTIBILIDAD DEL OS.....	127
SNPs en el gen <i>MDM2</i>	127
Revisión sistemática y meta-análisis SNPs <i>MDM2</i>	134
SNP en el gen <i>CTLA4</i>	142
Revisión sistemática y meta-análisis del SNP en <i>CTLA4</i>	145
SNPS EN GENES RELACIONADOS CON LOS MIRNAS.....	149

Búsqueda de miRNAs desregulados en la susceptibilidad del OS.....	149
SNPs en genes de procesamiento de miRNAs	151
SNPs en genes de pre-miRNAs	154
ANEXO	165
<u>DISCUSIÓN</u>	207
SNPS EN EL GEN <i>MDM2</i>	209
SNPS EN EL GEN <i>CTLA4</i>.....	211
SNPS EN GENES RELACIONADOS CON LOS MIRNAS.....	213
SNPs en genes de procesamiento de miRNAs.....	213
SNPs en pre-miRNAs.....	216
<u>CONCLUSIONES</u>	227

INTRODUCCIÓN

OSTEOSARCOMA

1.1 DEFINICIÓN

El osteosarcoma (OS) o sarcoma osteogénico es el cáncer óseo primario más común, representando aproximadamente el 20% de todos los cánceres óseos primarios (1, 2). Se trata de un tumor intramedular severo caracterizado por la destrucción del tejido óseo y tejido blando debido a la presencia de células neoplásicas malignas que producen hueso inmaduro, también denominado osteoide (3).

1.2 EPIDEMIOLOGÍA

El OS es el tumor óseo primario sólido más frecuente, con una incidencia en torno a 4-5 casos por millón de habitantes. Aunque puede darse en todos los grupos de edad, se presenta principalmente en niños, adolescentes y adultos jóvenes y, de hecho, el 70% de los casos se producen en menores de 40 años.

En general, el OS es ligeramente más frecuente en varones que en mujeres en una proporción 1,35:1 (3). Según Parkin DM y cols existe una mayor incidencia de OS pediátrico en el Sur de Europa (4). Según los datos del Registro Nacional de Tumores Infantiles (RNTI), el número de pacientes entre 0 y 15 años diagnosticados anualmente en España oscila entre 32 y 36 (<http://www.uv.es/rnti/cancerinfantil.html>).

En los pacientes jóvenes, la incidencia del OS se ha correlacionado con la pubertad y el crecimiento óseo (5, 6). Se ha descrito un segundo pico de incidencia mucho más pequeño en la tercera edad, relacionado con enfermedades óseas preexistentes como la enfermedad de Paget (constituye aproximadamente el 1% de los casos de OS) o tejidos previamente irradiados (aproximadamente el 4% de los casos).

1.3 FACTORES PRONÓSTICOS Y TRATAMIENTO

El OS es una enfermedad agresiva y frecuentemente mortal. El tratamiento estándar combina quimioterapia (doxorubicina, carboplatino, ifosfamida y metotrexato) y cirugía (7) siendo la tasa de supervivencia a cinco años del 50%-70% en tumores localizados y en torno al 20% en los casos de OS metastásico (mal pronóstico).

Además de las metástasis, se conocen otros factores de mal pronóstico como la localización del tumor en el extremo proximal o en el esqueleto axial, el tamaño y volumen del mismo y una mala respuesta a la quimioterapia pre-operatoria (3).

1.4 CARACTERÍSTICAS DEL TUMOR

El OS se origina en sitios de rápido crecimiento óseo y muestra predisposición por las extremidades de huesos largos; en particular, el fémur distal, la tibia y el húmero proximal (Figura 1a). Aunque los huesos largos son el lugar más frecuente para el desarrollo del OS, su incidencia relativa en huesos no-largos (p. ej. pelvis, columna vertebral y cráneo) tiende a incrementarse con la edad (3).

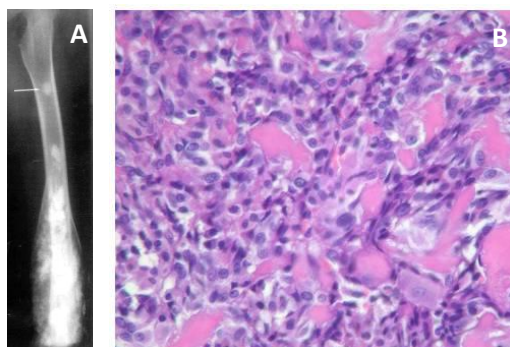


Figura 1. A) Radiografía de OS en fémur (3). B) Población densa de células fusiformes mostrando atipia nuclear y producción osteoide -material eosinófilo (8).

1.4.1 Características histopatológicas

A nivel histológico, el OS se caracteriza por la presencia de células fusiformes osteoblásticas de malignidad evidente productoras de osteoide (Figura 1b). El osteoide es el conjunto de osteoblastos, osteocitos y matriz orgánica aún no mineralizada; es decir, la matriz ósea, recién formada, no calcificada, adyacente a los osteoblastos activos. Existen diferentes subtipos histológicos de OS, que se clasifican por las características del tumor (aspecto, crecimiento y capacidad de extensión), de las células malignas (alto y bajo grado) o por su localización. Con respecto a la localización, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce 12 subtipos de tumores osteogénicos malignos. Aproximadamente, el 80% de los casos de OS son del subtipo OS convencional que se caracterizan porque el tumor se localiza en la cavidad medular del hueso (9). El OS convencional, además de tejido osteoide, también puede producir tejido fibroso y cartilaginoso. En la actualidad, la OMS admite tres subtipos de OS convencional dependiendo del material predominante presente en la matriz: OS osteoblástico (76-80%), OS condroblástico (10-13 %) y OS fibroblástico (10 %) (3). A pesar de presentar diferencias histológicas, el comportamiento clínico y el manejo médico son similares en los diferentes subgrupos.

1.4.2 Características genéticas

A nivel genético, el OS convencional presenta cariotipos complejos con múltiples aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales. Estudios de arrays de hibridación genómica comparada (CGH) en tejido tumoral han detectado amplificaciones recurrentes y ganancias en el número de copias en distintas localizaciones cromosómicas: 1p36, 1q21-22, 6p12-21, 8q21-24, 12q11-14, 17p11-13 y 19q12-13. En menor medida, también se han detectado pérdidas en 3q13, 8p21, 9p13 y 13q14 (3). En estas regiones se han descrito múltiples genes candidatos, algunos de los cuales podrían tener una implicación biológica directa en la osteosarcomagénesis. Por ejemplo, la delección o pérdida de heterocigosidad (*loss of heterocosity*, LOH) en 3q13, donde se localiza el gen *limbic system-associated membrane protein (LSAMP)*, ha sido asociada con la progresión y una peor supervivencia del OS (10). La amplificación de la región 6p12-21, que ocurre en el 40-50% de los tumores, alberga el gen *runt-related transcription factor 2 (RUNX2)*, encargado de la diferenciación osteoblástica (11) y el gen *vascular endothelial growth factor A (VEGFA)* involucrado en la angiogénesis (12). Otro ejemplo es la amplificación y ganancia de la región 8q21-24, observada en el 45-55% de los

tumores que incluye el oncogen *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (MYC)* (13-15), implicado en muchos procesos tumorigénicos.

Los genes de la vía de la reparación del ácido desoxiribonucleico (ADN) y del ciclo celular también se han visto alterados en este tipo de tumor. Con respecto a los genes implicados en la reparación y estabilización del genoma cabe destacar el gen del retinoblastoma (*RB1*) en la región 13q14 y el gen de la proteína supresora de tumores p53 (*TP53*) en 17p13.1, inactivados en aproximadamente el 35% y 40% de los OS esporádicos, respectivamente (16-18). En ambos casos, se ha observado que la inactivación de los genes se debe a mutaciones, LOH o deleciones del propio gen. Con una frecuencia menor también se encuentran alterados los genes protooncogen *MDM2*, (antagonista del gen *TP53*) amplificado en un 10% de los OS esporádicos y el gen *RecQ protein-like 4 (RECQL4)*, mutado en el 5% de los tumores (18, 19). Con respecto a los genes implicados en el ciclo celular, la amplificación de las ciclinas *CDK4* en 12q13-14 y *CCNE1* en 19q12 ha sido detectada en el 10% de los tumores (20, 21).

Recientemente, además, mediante estudios de *Next Generation Sequencing (NGS)* o secuenciación masiva del genoma del tejido tumoral del OS, se ha descrito un nuevo mecanismo genético denominado *chromotripsis* (demolición del cromosoma) implicado en el desarrollo de la enfermedad. Este fenómeno se caracteriza por alternar variaciones en número de copia (CNV) y LOH en un brazo del cromosoma o puede afectar al cromosoma completo (22). Este mecanismo parece estar implicado en el desarrollo de los casos esporádicos de OS (23).

A pesar de todos los estudios realizados, no se ha logrado definir ninguna aberración cromosómica específica de este tumor.

1.5 ETIOLOGÍA

En relación a las causas que originan el OS se han descrito factores ambientales (trauma, radioterapia o quimioterapia previa y lesiones óseas benignas,) y los factores genéticos (mutaciones heredadas o somáticas).

La aparición del OS es muy frecuente en zonas con mucha renovación de tejido óseo donde las células madre mesenquimales (CMM) proliferan y se diferencian rápidamente a células del hueso y cartílago. Esta rápida división favorece la aparición de mutaciones y por tanto, el origen de las células madre tumorales (24).

Actualmente existen dos teorías para explicar la aparición de OS. La primera de ellas postula que las mutaciones se producen en distintos puntos durante la diferenciación de los osteoblastos precursores a maduros (25), dando lugar a distintos subtipos histológicos (condroblástico, fibroblástico y osteoblástico). La segunda hipótesis apunta que las mutaciones se originan en un único osteoblasto precursor, surgiendo de aquí los distintos subtipos histológicos mencionados previamente (26) (Figura 2).

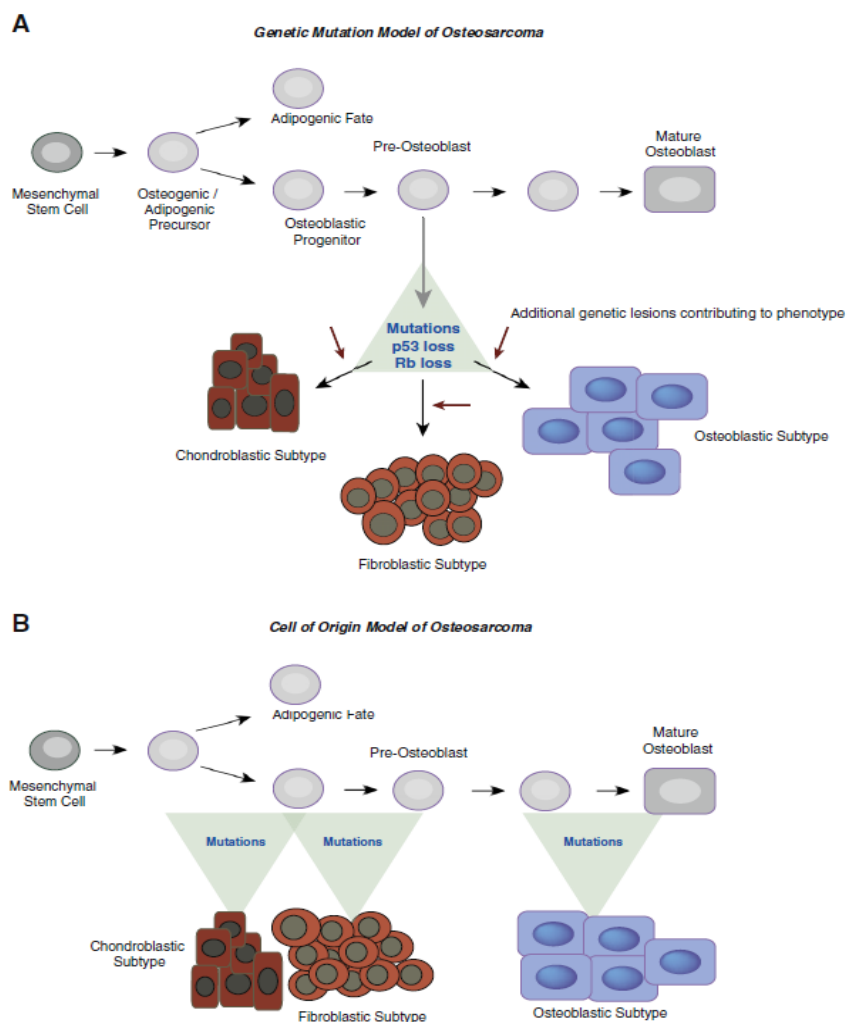


Figura 2. Teorías del origen del osteosarcoma (27)

1.6 SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA DEL OSTEOSARCOMA

El hecho de que el OS se produzca a una edad temprana sugiere que existe un fuerte componente genético en su origen. La existencia de este componente genético viene avalada también, por el hecho de que diversas enfermedades genéticas como Síndrome de Li-Fraumeni, Retinoblastoma hereditario, Síndrome de Rothmund-Thomson, Síndromes de Bloom y de Werner y la Anemia de Diamond Blackfan, tienen un riesgo aumentado a desarrollar OS (Tabla 1). Todas estas enfermedades están causadas por mutaciones de alta penetrancia en genes implicados en la reparación y mantenimiento del ADN (28).

Tabla 1. Síndromes de predisposición hereditaria al cáncer relacionados con la aparición de OS (adaptado de (28)).

Síndrome	Gen
Li-Fraumeni	<i>TP53</i>
Retinoblastoma	<i>RB1</i>
Rothmund Thomson	<i>REQL4</i>
Werner	<i>WRN</i>
Bloom	<i>BLM</i>
Diamond Blackfan	Proteínas ribosómicas

Sin embargo, todos estos desórdenes son extremadamente raros, constituyendo el 5% de los casos de OS (1). La mayor parte de los OS son esporádicos y no se deben a mutaciones en los genes antes mencionados. Diversos estudios han sugerido que la susceptibilidad a desarrollar OS se debe a pequeñas variantes comunes de baja penetrancia, es decir, variantes en genes que por sí solas contribuyen de forma débil al desarrollo de la enfermedad (28), por lo que es necesario la suma de pequeños efectos para conferir la susceptibilidad a la enfermedad. Una de las variantes genéticas comunes más frecuentes en el genoma son los cambios de un único nucleótido (SNPs) (Figura 3). Se estima que en el genoma hay 10 millones de SNPs distribuidos con una frecuencia media de 1/300 pares de bases (pb), constituyen el 90 % de la variación del genoma humano (28).

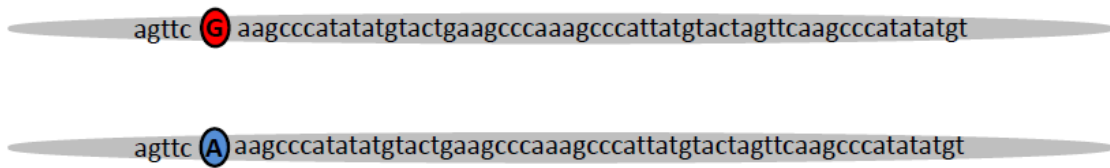
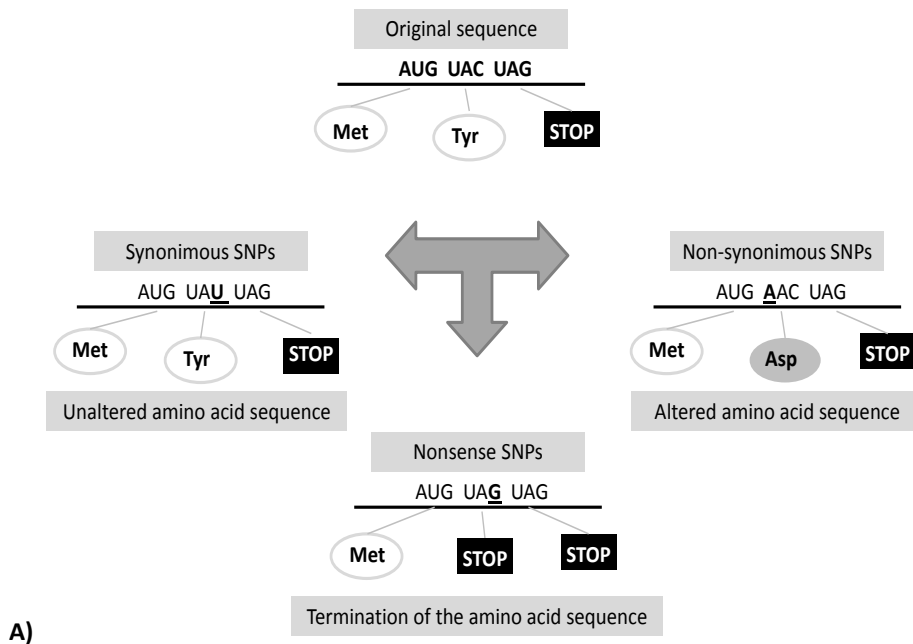


Figura 3. Ejemplo de un SNP. Dos cromosomas de un individuo con el genotipo G/A para el SNP (elaboración propia).

Los SNPs están distribuidos a lo largo de todo nuestro genoma tanto en regiones génicas como en regiones extragénicas. En el caso de los genes, el cambio de alelo de un SNP puede afectar a la secuencia de la proteína (cambio de aminoácido (aa), lugar de inicio o finalización, lugar de *splicing*) o a su regulación (promotor, sitios CpG, unión o estructura del ARN no codificante (ncRNA), región UTR) (Figura 4).



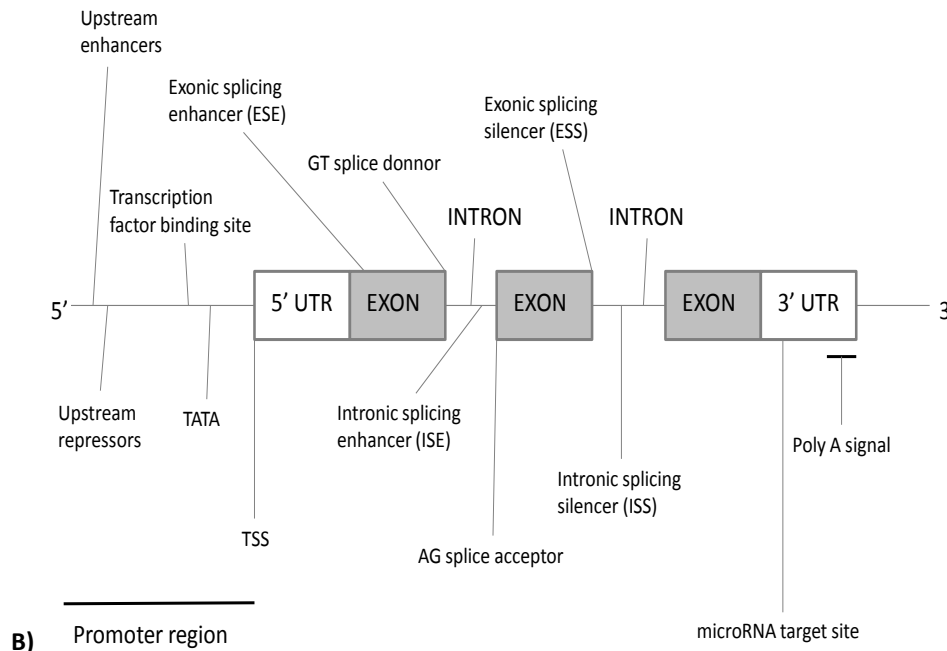


Figura 4. A) SNPs en los exones con posible efecto funcional en la secuencia aminoacídica. **B)** SNPs con otros posibles efectos funcionales sobre el gen.

La implicación de las variantes genéticas comunes en la susceptibilidad a desarrollar cáncer ya se ha demostrado en diversos estudios. En el caso de la leucemia linfoblástica aguda, uno de los cánceres pediátricos más comunes en este momento, se estima que el 25% de la susceptibilidad se debe a variantes genéticas comunes ya identificadas en los genes *ARID5B*, *IKZF1*, *PIP4K2* y *CEBPE* (29), pero todavía es necesario detectar otras variantes menos comunes que expliquen el resto.

En el caso del OS, el estudio de la implicación de SNPs en el riesgo a desarrollar la enfermedad se ha abordado siguiendo dos estrategias: búsqueda en genes candidatos o mediante el estudio del genoma completo

1.6.1 Estudios de genes candidatos

Los estudios de genes candidatos se basan en la selección *a priori* de genes potencialmente implicados en la biología del OS. Por esta razón, la interpretación de los resultados en este tipo de estudios resulta relativamente sencilla, dado que se parte de una hipótesis previa.

En OS, hasta el momento, se han realizado 37 estudios de genes candidatos, en los que se han analizado un total de 5250 SNPs en 283 genes (Tabla anexa 1). La mayoría de los genes (n=250) fueron analizados tan solo una vez, obteniendo en gran parte de ellos resultados de no

asociación o con asociaciones de poco valor estadístico. Solamente 10 genes fueron estudiados más de dos veces. Centrándonos en estos 10 genes, observamos que en 5 de ellos (*IGF2R*, *TGFBR1*, *COL1A1*, *RECQL4* y *NBN*), a pesar del número elevado de SNPs analizados, ninguno se analizó en más de un estudio (n=42) (Tabla 2). En 3 genes (*TP53*, *GH1* e *IGF1*) encontramos 4 SNPs que se estudiaron al menos 2 veces, pero los resultados entre los estudios eran contradictorios y con poco valor estadístico. Solamente en 2 genes, *MDM2* y *CTLA4*, se analizaron 3 SNPs en más de un estudio y los resultados fueron significativos en dos trabajos o más. Estos resultados y la función de estos genes sugieren la posible implicación de estos genes en la etiología del OS (Tabla 3).

El gen *MDM2* es un factor importante en la regulación de la homeostasis celular y controla procesos como el crecimiento celular, apoptosis y senescencia mediante la interacción con proteínas como p53, pRB y E2F1 (30, 31). Este gen codifica una proteína nuclear E3 ubiquitín ligasa que regula la degradación de la proteína supresora de tumores p53 (32). La función de la proteína MDM2 podría verse alterada por polimorfismos en el gen. Por ello, diversos trabajos han analizado la asociación entre dichos polimorfismos y el riesgo de OS. Los dos polimorfismos más estudiados son rs1690916 y rs2279744, localizados en diferentes regiones reguladoras del gen *MDM2*, lo que podría alterar la expresión de la proteína (Figura 5). Estos dos polimorfismos han sido asociados a OS en varios estudios (33-36), lo que les convierte en posibles marcadores de riesgo de esta patología.

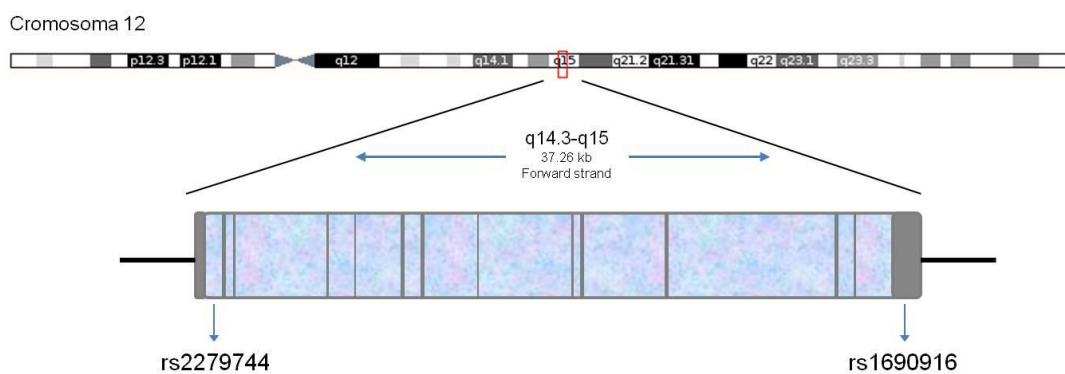


Figura 5. Localización de los polimorfismos rs1690916 y rs2279744 en el gen *MDM2*.

El gen *CTLA4* es miembro de la familia de las inmunoglobulinas y codifica para una proteína que transmite una señal inhibitoria a los linfocitos T, células clave en la respuesta antitumoral (Figura 6). La proteína CTLA4 podría elevar el umbral de activación de las células T, atenuando la respuesta antitumoral e incrementando la susceptibilidad a desarrollar cánceres (37, 38).

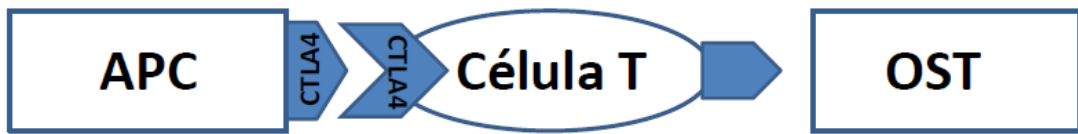


Figura 6. Función del gen *CTLA4*. Representación hipotética de interacción entre células T y células tumorales de OS (adaptado de (39)).

Hasta el momento, se han estudiado 6 SNPs en el gen *CTLA4* en relación con el riesgo a desarrollar OS. Entre ellos, el más estudiado es rs231775 (+49G>A), una variante de cambio de sentido o *missense* que provoca un cambio de treonina por alanina, lo que lleva a una mayor eficacia y a un incremento de la producción de CTLA4 (40). Este SNP ha sido asociado a diferentes tipos de cáncer, como el cáncer de mama, cáncer de pulmón o cáncer colorrectal (41-43) y se ha asociado con el riesgo de OS en al menos dos estudios. En este caso, también este polimorfismo podría estar asociado a la etiología del OS.

Tabla 2. Listado de 5 genes analizados en relación con el riesgo de OS en más de dos artículos

	Gen	Polimorfismos	Casos	Controles	Asociación	Bibliografía
Genes con SNPs analizados en un único estudio	IGF2R	rs1003737	290	NA	SI	(44)
		rs12202350	96	1426	SI	(35)
		rs2282141	96	1426	SI	
		rs2297372	96	1426	SI	
		rs384167	96	1426	SI	
		rs600324	96	1426	SI	
		rs9456484	96	1426	SI	
		rs1570070	104	74	NO	(45)
		rs1803989	104	74	SI	
		rs2065396	104	74	NO	
		rs2282140	104	74	NO	
		rs3777411	104	74	NO	
		rs3798180	104	74	NO	
		rs416572	104	74	NO	
		rs435612	104	74	NO	
		rs4709390	104	74	NO	
		rs4709392	104	74	NO	
		rs4709393	104	74	NO	
		rs629849	104	74	NO	
		rs648253	104	74	NO	
	rs687088	104	74	NO		
	rs7746102	104	74	NO		
	rs894817	104	74	NO		
	rs9456497	104	74	NO		
	rs998074	104	74	SI		
	rs998075	104	74	SI		
	TGFBR1	rs1800469	202	216	ND	(46)
		rs1800470	202	216	SI	
		rs334354	168	168	SI	(47)
		rs10819639	96	1426	NO	(35)
		rs11466445	168	168	SI	(47)
	COL1A1	rs1061970	189	195	SI	(48)
		rs2075559	189	195	SI	
		rs17639446	96	1426	SI	(35)
		rs1800012	72	143	NO	(49)
	RECQL4	Polimorfismos	96	1426	ND	(35)
rs4251689		98	69	NO	(50)	
rs2721191		71	82	NO	(51)	
rs372372052		71	82	NO		
NBN	rs1805794	120	120	SI	(52)	
	rs709816	120	120	NO		
	rs1063054	120	120	NO		
	rs13312970	96	1426	SI	(35)	
	Polimorfismos	98	69	ND	(50)	

Abreviaturas: 1. ND: No disponible.

Tabla 3. Listado de 5 genes analizados en relación con el riesgo de OS en más de dos artículos.

	Gen	Polimorfismos	Casos	Controles	Asociación	Bibliografía
Genes con SNPs que muestran resultados contradictorios en al menos 2 estudios	TP53	rs2909430	96	1426	NO	(35)
		rs1042522	201	250	SI	(33)
		rs8079544	74	104	NO	
		rs1642785	74	104	NO	
		rs1042522	74	104	NO	
		rs9895829	74	104	NO	
		rs2909430	74	104	NO	
		rs1800372	74	104	NO	(53)
		rs1625895	74	104	NO	
		rs12947788	74	104	NO	
		rs1614984	74	104	NO	
		rs9894946	74	104	NO	
		rs56275308	17	37	ND	
		rs17878362	17	37	ND	(34)
	GH1	rs7921	24	96	NO	(36)
		rs7921	96	1426	SI	(35)
		rs11079515	96	1426	SI	
		rs6771	104	74	NO	(45)
		rs6173	104	74	NO	
	IGF1	rs7956547	24	96	NO	(36)
		rs10860864	96	1426	SI	
		rs10860869	96	1426	SI	
		rs17796225	96	1426	SI	
		rs2195240	96	1426	NO	
		rs2288378	96	1426	SI	(35)
		rs5742692	96	1426	SI	
rs5742714		96	1426	SI		
rs7956547		96	1426	SI		
rs9651925		96	1426	SI		
rs1019731		104	74	NO		
rs2162679	104	74	NO	(45)		
rs2288378	104	74	NO			
rs6220	104	74	NO			
Genes con SNPs significativos en más de dos estudios	MDM2	rs2279744	96	1426	NO	
		rs1690916	96	1426	SI	
		rs1196334	96	1426	SI	(35)
		rs1695147	96	1426	SI	
		rs1846402	96	1426	SI	
		rs201821879	415	431	SI	
		rs199812774	415	431	SI	(54)
		rs1690169	24	96	SI	(36)
		rs2279744	201	250	SI	(33)
	rs2279744	17	37	SI*	(34)	
	CTLA4	c.75G>C	415	316	SI	(55)
		c.326G>A	415	316	SI	
		rs231775	267	282	SI	
		rs4553808	267	282	NO	(56)
		rs5742909	267	282	NO	
CT60A/G		267	282	NO		
rs231775	205	216	SI	(57)		

Abreviaturas: ND: No disponible. *: Valores significativos obtenidos a partir de los datos brutos del artículo. En rojo, estudios analizando rs2279744; en verde, estudios analizando rs1690916 y en azul, estudios analizando rs231775.

En resumen, bajo la estrategia de genes candidatos, observamos que los únicos SNPs asociados y replicados en al menos dos estudios fueron los SNPs rs2279744 y rs1690916 en

MDM2 y rs231775 en *CTLA4*. Esto sugiere que estos 3 SNPs son, hasta el momento, los únicos SNPs que pueden ser “marcadores” de susceptibilidad a desarrollar OS.

1.6.2 Estudio de genoma completo

La segunda estrategia de búsqueda de variantes genéticas comunes se basa en el estudio del genoma completo o GWAS (*Genome Wide Association Study*). Hasta el momento se ha realizado un único GWAS en OS, incluyendo 941 casos y 3291 controles. Los autores de este estudio encontraron dos *loci* asociados con la susceptibilidad al OS (58). El SNP más significativo se localizó en una zona cercana al gen *GRM4*, miembro de la familia de los receptores glutamatérgicos, que se expresan en osteoblastos (formación del hueso) y osteoclastos (reabsorción del hueso) (59). Los autores proponen que el gen *GRM4* podría participar en la diferenciación y regulación de osteoblasto, células claves en la formación del hueso (58). El segundo *loci* más significativo se localizó en una zona intergénica. En este caso los autores solo encuentran una explicación: este SNP está en desequilibrio de ligamiento ($r^2 > 0,6$) con SNPs que alteran la unión de factores de transcripción y/o motivos reguladores *in silico*. Un dato de interés de este estudio es el hecho que, además de este SNP localizado en una región intergénica, otros 8 de los 30 SNPs más significativos encontrados en el GWAS se encontraron en regiones intergénicas, aproximadamente un 30% (58).

La mayoría de los estudios realizados hasta el momento en OS se han centrado en la búsqueda de variantes genéticas en regiones codificantes. Sin embargo, tal y como pone de manifiesto el GWAS, hay variantes asociadas con la enfermedad en regiones intergénicas sin ningún tipo de explicación biológica aparente. De hecho, en los diferentes GWAS realizados hasta la fecha en diferentes tipos de cáncer, se han descrito alrededor de 300 SNPs significativos, de los cuales sólo el 3,3% provocan cambios en la proteína, el 40% están localizados en regiones intrónicas y el 44% se localizan en regiones intergénicas. Estos resultados “inesperados” llevan a pensar que las regiones no codificantes pueden ser un punto clave en el desarrollo del cáncer (60).

REGIONES NO CODIFICANTES

En 2001 como resultado del Proyecto Genoma Humano se publicó el mapa provisional del genoma revelando que el número real de secuencias que codifican proteínas se corresponde con solo 20000-25000 genes, aproximadamente un 1,5% del genoma (61). En un principio, la región restante no funcional del genoma se consideró “ADN basura”.

Posteriormente, el proyecto ENCODE (ENcyclopedia Of DNA Elements), un proyecto cuyo objetivo principal era delinear todos los elementos funcionales codificados en el genoma humano (62), reveló que más de un 80% del genoma se transcribe como elementos que no codifican a proteínas llamados ARNs no codificantes o ncRNA.

Los ncRNAs se clasifican en función de su tamaño. Dentro del grupo de los ncRNA de pequeño tamaño, están los microRNAs (miRNAs) (18-20 pb) (63) (Figura 7).

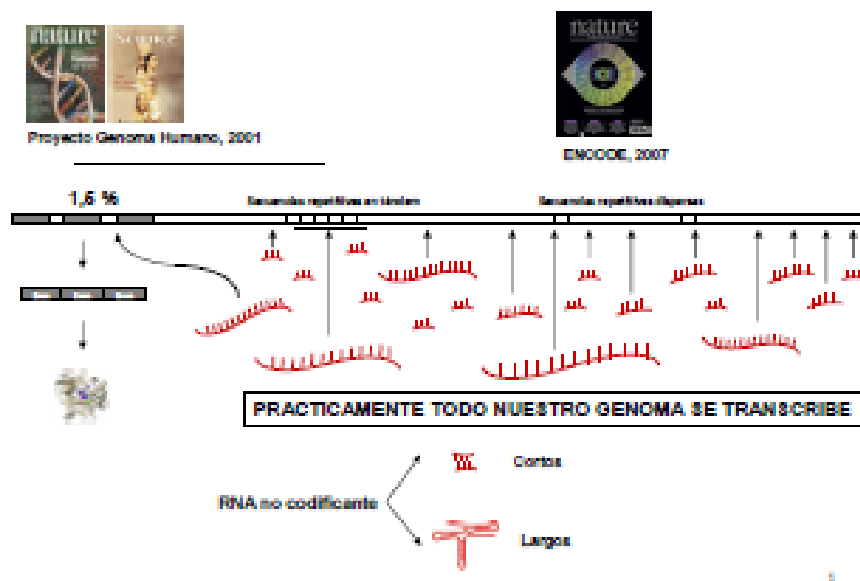


Figura 7. Transcripción del genoma (elaboración propia).

2.1 miRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son un tipo de ncRNA que regulan aproximadamente el 50% de nuestros genes (63). Los miRNAs se transcriben a partir de diferentes localizaciones del genoma mediante la ARN polimerasa II en forma de transcritos primarios largos denominados pri-miRNAs (ADN de doble cadena, 300-5000pb). Los pri-miRNAs se caracterizan por presentar una región central de ARN de doble cadena (dsRNA), de unos 30-40 nucleótidos, un lazo u

horquilla terminal y dos regiones de ARN de cadena sencilla (ssRNA) a cada extremo opuesto de la región central. Estos pri-miRNAs van a ser procesados en el núcleo mediante la RNAsa DROSHA y la proteína DGCR8, que contiene dominios de unión al dsRNA. La secuencia de dsRNA determina su estructura secundaria y su unión a las proteínas de procesamiento.

Tras el procesamiento de los pri-miRNAs, las nuevas moléculas formadas mantienen la estructura de dsRNA y la horquilla terminal. Estas moléculas de menor tamaño (aproximadamente 70 nucleótidos) se conocen con el nombre de pre-miRNAs. Los pre-miRNAs se exportan desde el núcleo hasta el citoplasma por medio de la proteína Exportina5 (Xpo-5) y la GTPasa RAN (64, 65). En el citoplasma, los pre-miRNAs se procesan nuevamente por la enzima Dicer (66-68) que junto con TARBP2, eliminan la estructura en forma de horquilla, generando una molécula de dsRNA conocida como dúplex de miRNA (69). El dúplex de miRNA debe separarse para formar el miRNA maduro que es de cadena sencilla. La cadena seleccionada del dúplex de miRNA se incorpora al complejo multiprotéico conocido como RISC (*RNA-inducing silencing complex*), compuesto por los genes *EIF2C1*, *EIF2C2*, *SND1*, *GEMIN3*, *GEMIN4* y el complejo CCR-NOT (70). El miRNA ya maduro es transportado por el complejo RISC hasta el, o los ARN mensajeros (mRNA) objeto de la regulación (71). El miRNA se une al ARN mensajero por complementariedad de bases (Figura 8).

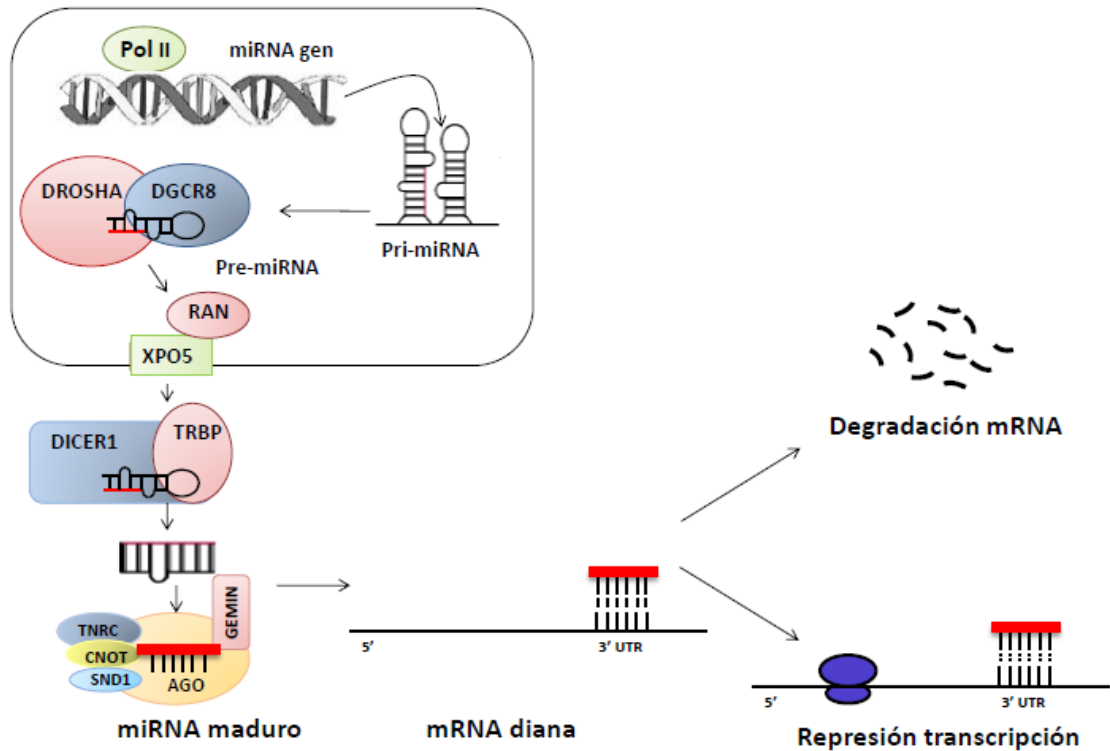


Figura 8. Descripción general de la biogénesis y mecanismo de acción de los miRNAs (adaptado de (72)).

Los miRNAs presentan una secuencia característica de reconocimiento de dianas de aproximadamente 7 pb conocida como región semilla o *seed*. El miRNA actúa por unión específica de la secuencia *seed* a una secuencia complementaria en la que cuando la complementariedad es exacta se produce la degradación del mRNA, mediante el complejo RISC. En el caso en el que no haya complementariedad total en la unión se produce el silenciamiento de la traducción (73).

Los miRNAs regulan genes implicados en numerosos procesos biológicos como desarrollo, diferenciación y proliferación celular, así como hematopoyesis, angiogénesis y apoptosis (74). Sin embargo, debido a que la secuencia complementaria al *seed* de un miRNA, es corta, por probabilidad se podrá encontrar en más de un lugar de nuestro genoma. Por tanto, un miRNA puede degradar o reprimir la traducción de muchos mRNA dianas que contengan secuencias complementarias a su región *seed*. Pero también existe la posibilidad de que un gen puede ser regulado por múltiples miRNAs (Figura 9). Para cada miRNA, hoy en día, existen muchas bases de datos (Mirwalk y Targetscan entre otras) que proponen *in silico* posibles dianas de miRNAs. Sin embargo, pocas interacciones están validadas experimentalmente.

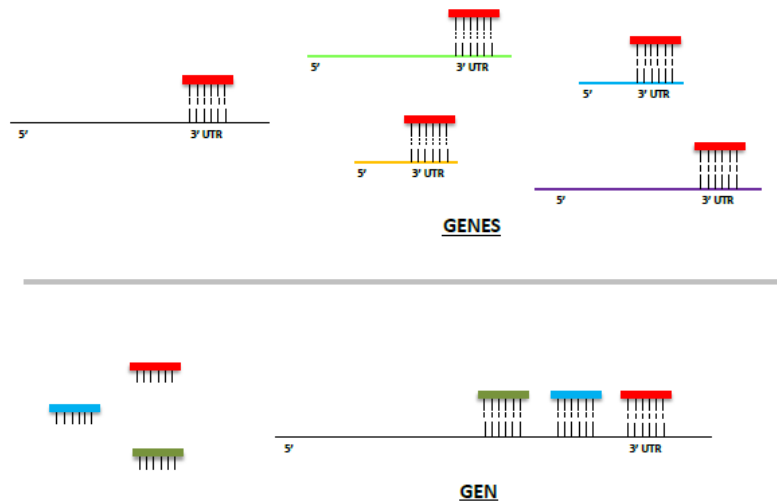


Figura 9. Representación de la unión mediada por los miRNAs. A) un miRNA puede regular varias dianas, B) Un gen puede estar regulado por mas de un miRNA (elaboración propia).

Además, los miRNAs pueden agruparse en familias, miRNAs que comparten la totalidad o parte de la secuencia de nucleótidos de la región *seed*; o en grupos génicos (*clusters* de miRNAs) formados por miRNAs localizados en la misma región dentro del genoma transcrito como una larga cadena de ARN (75). Al compartir la región *seed*, los miembros de una misma familia de miRNAs son potenciales reguladores del mismo conjunto de mRNAs (76, 77).

La regulación mediada por los miRNAs puede verse afectada tanto por alteraciones en los niveles de los miRNAs (debido a cambios en los genes de procesamiento y/o pre-miRNAs) o por cambios en la secuencia de unión a la diana. Por un lado, en cuanto a alteraciones en los genes de procesamiento de miRNAs, cualquier alteración en dichos genes puede cambiar los niveles de miRNAs que afectaran, a su vez, a la regulación de sus genes diana (78). En consecuencia, SNPs en genes de procesamiento podrían alterar la función de éstos y por tanto, alterar los niveles de los miRNAs (79) (Figura 10).

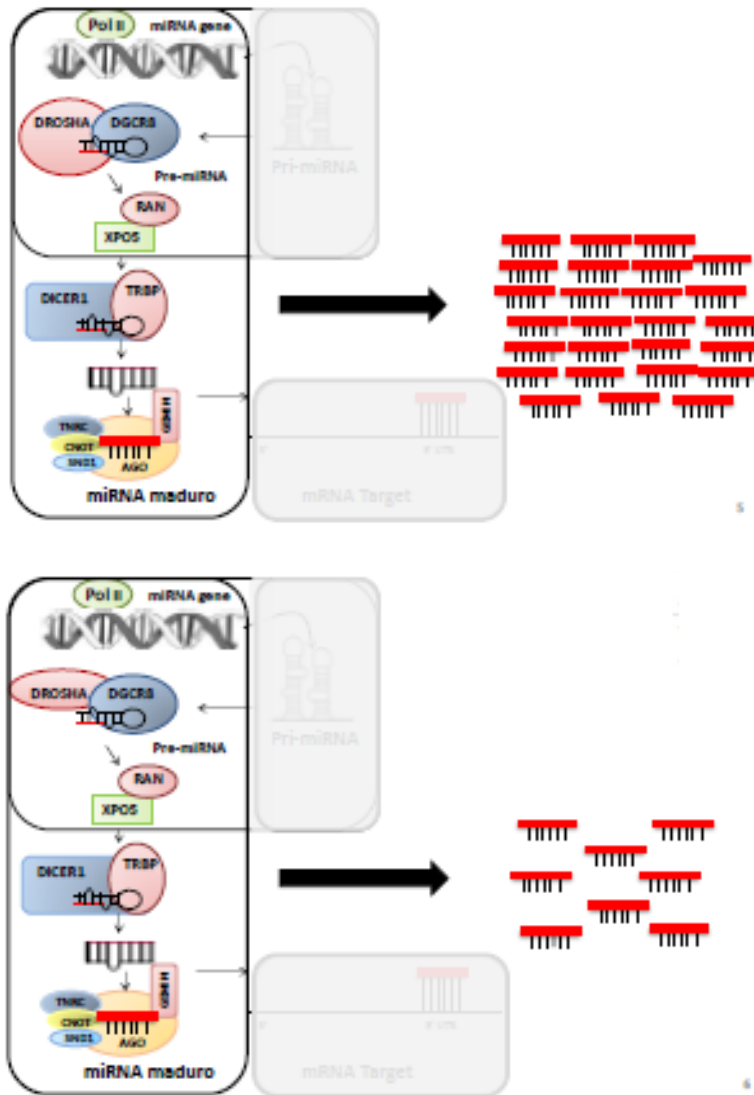


Figura 10. Variantes genéticas en genes de procesamiento de miRNAs (como el gen *DROSHA*) pueden alterar los niveles de los miRNAs (elaboración propia).

Además, la secuencia de los miRNAs determina por un lado, su estructura secundaria, y por otro lado, la especificidad de unión a sus dianas. Alteraciones en la estructura afectarán al procesamiento y por tanto, a los niveles de miRNAs y cambios en la secuencia *seed* afectarán a la unión con el mRNA. Por lo tanto, polimorfismos en el pri-, pre-, miRNA maduro pueden variar los niveles y la función de los miRNAs (Figura 11 A y B).

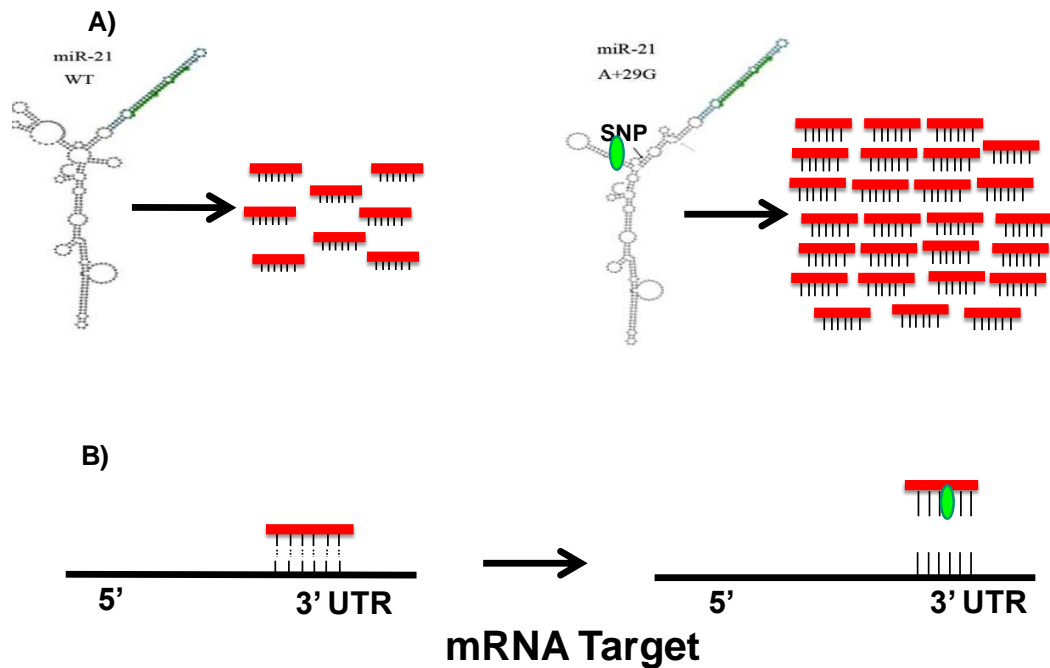


Figura 11. SNPs en el pre-miRNA pueden A) alterar la estructura secundaria del miRNA, afectando así los niveles de expresión o B) alterar la secuencia de unión del miRNA, alterando entonces la unión a su diana (elaboración propia).

2.2 Genes de procesamiento de miRNAs y cáncer

Recientemente, se ha demostrado la implicación de los genes de la ruta de procesamiento de los miRNAs en los procesos de transformación celular y tumorigénesis (80). Por ejemplo, varios genes de esta ruta están desregulados en cáncer, bien porque están sobre-expresados, como *EIF2C2* (complejo AGO) y *TARBP2* (complejo DICER) en cáncer de próstata, o porque están sub-expresados, como *DROSHA* y *DICER* en cáncer de mama (81). Diversos estudios han observado además, que alteraciones en los genes de esta ruta afectan a los niveles de miRNAs (82-85). De hecho, en cáncer de pulmón se ha demostrado que un SNP en *DROSHA* (rs640831) provoca la desregulación de 56 miRNAs (86). Otros ejemplos de polimorfismos en 7 genes de la ruta del procesamiento de miRNAs asociados con cáncer aparecen en la Tabla 4.

Tabla 4. SNPs en genes de procesamiento de miRNAs asociados a cáncer.

Gen	SNP	Enfermedad	Referencia
TNRC6B	rs139919	Leucemia linfoblástica aguda	(87)
XPO5	rs11077	Carcinoma hepatocelular	(88)
RAN	rs14035	Cáncer oral	(89)
AGO	rs636832	Cáncer pulmón	(90)
DGCR8	rs417309	Cáncer de mama	(91)
	rs197412	Cáncer oral	(89)
GEMIN3	rs197414	Cáncer de vejiga	(93)
	rs197412	Carcinoma renal	(94)
	rs2740348	Cáncer próstata	(95)
	rs7813		
GEMIN4	rs2740351	Cáncer ovario	(96)
	rs7813		
	rs2740351	Cáncer renal	(94)
	rs7813		

A pesar de estas evidencias, por el momento existen pocos estudios que analicen la implicación de SNPs en genes de procesamiento de miRNAs en el riesgo a desarrollar OS.

2.3 miRNAs y cáncer

El papel de los ncRNAs en la tumorigénesis está hoy en día demostrado. Dentro de los ncRNA, los miRNAs han sido los más estudiados. Hasta la fecha, diversos trabajos han mostrado que la expresión de los miRNAs difiere entre tejido normal y tumoral (97-99), estando generalmente disminuía en tejidos tumorales (100). Estos estudios han permitido clasificar los miRNAs en dos grupos: oncomirs (miRNAs sobre-expresados en cáncer) y miRNAs supresores de tumores (miRNAs sub-expresados en cáncer).

En OS ya se han descrito miRNAs desregulados asociados con la enfermedad (101-103). Sin embargo, el papel de los miRNAs en la osteosarcomagénesis es aún desconocido. Se sabe que más de 600 miRNAs participan en la regulación de la osteogénesis, por lo que se piensa que la desregulación de cualquiera de estos miRNAs podría predisponer a enfermedades óseas (104). Por ejemplo, la ganancia de mir-34c inhibe la diferenciación de los osteoblastos y aumenta la osteoclastogénesis, debido a la supresión de la vía de señalización Notch, implicada en el mantenimiento del balance de proliferación y diferenciación celular (105). Otro ejemplo es la desregulación del *cluster* de miRNAs localizado en la región 14q32, asociado con la progresión y el pronóstico del OS (106).

El papel de los SNPs en pre-miRNAs/miRNAs (miR-SNPs) en la función de los miRNAs y su implicación en cáncer ha sido ampliamente estudiado. De hecho, ya se han realizado revisiones y meta-análisis (MA) que analizan la asociación entre mir-SNPs como rs2910164 en mir-146a, rs11614913 en mir-196a2, rs2292832 en mir-149 y rs3746444 en mir-499 y el riesgo de cáncer en más de 21 neoplasias (107, 108).

Específicamente en OS, solo se han realizado 2 estudios en los que se analizaron 4 SNPs en 4 miRNAs (mir-34b/c, mir-34a, mir-146 y mir-21) y de ellos, cabe destacar que se obtuvieron resultados significativos para 2 SNPs en miRNAs pertenecientes a la familia mir-34 (mir-34b/c y mir-34a) (109, 110). Sin embargo, a pesar de la importancia que parecen tener los miR-SNPs en el desarrollo del cáncer, son muy pocos los estudios realizados en OS.

Anexo

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidatos de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
1	ACD	ND	4	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
2	ACO1	rs4879580	35	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,14	ND	0,63	(111)
		rs7857056		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,16	ND	0,54	(111)
		rs10970943		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	0,82	ND	0,28	(111)
		rs7855483		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,76	ND	0,22	(111)
		rs1023087		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,85	ND	0,46	(111)
		rs7866419		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,95	ND	0,72	(111)
		rs1041320		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	ND	ND	ND	(111)
		rs1041321		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,00	ND	0,99	(111)
		rs7847742		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	1,15	ND	0,36	(111)
		rs10813808		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	0,98	ND	0,89	(111)
		rs6476361		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,94	ND	0,69	(111)
		rs10758138		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	1,15	ND	0,36	(111)
		rs17288067		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,73	ND	0,17	(111)
		rs4442231		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	1,16	ND	0,55	(111)
		rs11793098		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,69	ND	0,04	(111)
		rs4879583		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,81	ND	0,40	(111)
		rs13292540		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	1,06	ND	0,72	(111)
		rs7026133		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	1,40	ND	0,14	(111)
		rs10970971		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,05	ND	0,75	(111)
		rs10813813		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	1,00	ND	1,00	(111)
		rs7032871		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	0,93	ND	0,67	(111)
		rs10813814		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	1,06	ND	0,72	(111)
		rs2375965		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	ND	ND	ND	(111)
		rs4878497		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,94	ND	0,69	(111)
		rs10758139		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,93	ND	0,66	(111)
		rs7022554		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	1,25	ND	0,14	(111)
		rs12238573		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	ND	ND	ND	(111)
		rs12985		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,05	ND	0,77	(111)
		rs10970985		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,17	ND	0,32	(111)
		rs10970986		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,02	ND	0,93	(111)
		rs12006123		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,83	ND	0,32	(111)
		rs12555727		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,80	ND	0,25	(111)
rs12236816	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	ND	ND	ND	(111)			
rs10738890	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,01	ND	0,97	(111)			
rs3205166	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,00	ND	0,99	(111)			

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
3	AKR1C3	rs11252932	1	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,62	1,07-2,45	0,02	(35)
4	AKT	rs6973569	1	China	59	63	TaqMan	AG	1,19	0,49-2,86	ND	(112)
5	ALKBH3	rs12804822	32	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,20	(35)
6	APEX1	rs12878052	37	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,06	(35)
7	APTX	rs10971259	8	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,79	1,17-2,75	0,008	(35)
		rs10971263	8	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,46	0,24-0,87	0,017	(35)
8	AR	rs1415270	1	EEUU	290	NA	Sequenom platform iplex Gold	ND	0,53	ND	<0,0001	(44)
9	ARHGAP35	rs1052667	1	China	247	428	TaqMan	TT	7,35	3,95-13,68	1,92×10-11	(113)
10	ATM	rs1800889	20	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,27	0,08-0,87	0,028	(35)
		rs228606		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,39	1,03-1,88	0,029	(35)
		rs618499		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,73	0,54-1,00	0,049	(35)
		rs1800889	36	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	T	0,27	0,08-0,87	0,028	(50)
		rs228606		EEUU	98	69	iSelect from Illumina	T	1,39	1,03-1,88	0,029	(50)
		rs618499		EEUU	98	69	iSelect from Illumina	A	0,73	0,54-0,99	0,049	(50)
11	ATR	rs7632782	18	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,07	(35)
12	BLM	rs2532105	30	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,58	1,03-2,43	0,04	(35)
		rs2518968		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,37	1,01-1,85	0,04	(35)
		rs2532105	31	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	A	1,58	1,03-2,42	0,04	(50)
		rs2518968		EEUU	98	69	iSelect from Illumina	C	1,37	1,01-1,85	0,04	(50)
13	BMP6	rs270407	43	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,46	1,06-2,00	0,02	(35)
		rs1322239		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,57	0,34-0,95	0,03	(35)
		rs911749		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,62	0,40-0,97	0,04	(35)
		rs12210175		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,36	1,01-1,83	0,04	(35)
		rs270398		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,54	1,01-2,34	0,04	(35)
		rs267174		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,73	0,53-1,00	0,05	(35)
14	BRCA1	rs3737559	11	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,68	1,02-2,76	0,04	(35)
15	BRCA2	rs206117	43	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,26	(35)
16	BRIP1	rs9908659	18	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	0,64	0,46-0,88	0,005	(35)
		rs12937080		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	2,12	1,09-4,13	0,027	(35)
17	C19orf40	rs16967668	19	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,59	1,04-2,43	0,03	(35)
		rs4805834		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,57	0,33-0,99	0,04	(35)
18	CASC8 upstream	rs10808555	4	EEUU	99	1365	iSelect from Illumina	AG	1,61	1,04-2,48	0,03	(114)
		rs17766217		EEUU	99	1365	iSelect from Illumina	CC	0,56	0,28-1,13	0,1	(114)
		rs12155672		EEUU	99	1365	iSelect from Illumina	AA	1,59	0,92-2,76	0,098	(114)
		rs7386167		EEUU	99	1365	iSelect from Illumina	AA	1,95	1,12-3,39	0,018	(114)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
19	CCNH	rs7702564	12	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,73	0,54-0,99	0,05	(35)
		rs3093816	12	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,72	0,53-0,99	0,036	(35)
20	CD86+	rs1129055	1	China	205	216	PCR-RFLP	A	1,43	1,08-1,88	0,01	(115)
21	CDK7	rs12656918	11	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,41	(35)
22	CDKN1A	rs6912480	21	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,1300	(35)
23	CDKN1B	rs10492237	12	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,75	1,09-2,81	0,02	(35)
24	CDKN2A	rs10757261	14	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,87	ND	0,37	(111)
25	CDKN2A	rs3731257	29	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,44	1,05-1,96	0,02	(35)
		rs10757261	17	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,87	ND	0,37	(111)
		rs717326		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,89	ND	0,67	(111)
		rs7041637		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	1,33	ND	0,07	(111)
		rs3731257		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	1,44	ND	0,02	(111)
		rs3088440		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,75	ND	0,39	(111)
		rs11515		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,88	ND	0,61	(111)
		rs2811708		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	0,92	ND	0,62	(111)
		rs3731239		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,84	ND	0,27	(111)
		rs4074785		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,86	ND	0,61	(111)
		rs3731222		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,96	ND	0,88	(111)
		rs3731217		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,01	ND	0,98	(111)
		rs7036656		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,95	ND	0,74	(111)
		rs3218020		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	1,22	ND	0,18	(111)
		rs2811712		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,69	ND	0,22	(111)
		rs3218018		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,55	ND	0,08	(111)
		rs3218009		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,78	ND	0,35	(111)
	rs3731257	29		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,44	1,05-1,96	0,02	(35)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
26	CDKN2B	rs10738604	6	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,37	1,02-1,84	0,04	(35)
		rs3217992	14	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	1,13	ND	0,41	(111)
		rs1063192		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,01	ND	0,96	(111)
		rs3217986		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,87	ND	0,63	(111)
		rs495490		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,18	ND	0,53	(111)
		rs575427		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,19	ND	0,50	(111)
		rs573687		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,88	ND	0,41	(111)
		rs13298881		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,07	ND	0,80	(111)
		rs10811640		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	1,21	ND	0,21	(111)
		rs2106119		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,27	ND	0,11	(111)
		rs643319		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,82	ND	0,18	(111)
		rs518394		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,86	ND	0,34	(111)
		rs10738604		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	1,36	ND	0,04	(111)
		rs615552		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,89	ND	0,45	(111)
rs7049105	EEUU	96		1428	Illumina SNParray	G	1,18	ND	0,26	(111)		
27	CDKN2BAS	rs4977750	16	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,59	ND	0,05	(111)
		rs10965197		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	0,83	ND	0,25	(111)
		rs564398		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,95	ND	0,75	(111)
		rs17694493		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,79	ND	0,37	(111)
		rs11790231		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,76	ND	0,34	(111)
		rs1011970		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	0,64	ND	0,08	(111)
		rs10811650		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,24	ND	0,15	(111)
		rs4977756		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,91	ND	0,55	(111)
		rs16905599		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,70	ND	0,28	(111)
		rs1412832		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,85	ND	0,32	(111)
		rs10965228		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,25	ND	0,39	(111)
		rs1333040		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,86	ND	0,33	(111)
		rs10757274		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,03	ND	0,86	(111)
		rs944797		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	0,95	ND	0,71	(111)
rs10757278	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,07	ND	0,67	(111)			
rs10811661	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,25	ND	0,32	(111)			
28	CDKN2C	rs6668495	5	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,43	1,05-1,93	0,02	(35)
29	CDKN2D	rs10403668	6	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,21	(35)
30	CHEK1	rs492510	10	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,06	(35)
31	CHEK2	rs5752785	21	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,08	(35)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
32	COL1A1	rs17639446	1	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,60	1,02-2,52	0,04	(35)
		rs1800012	1	Spain	72	143	PCR-RFLP	ND	ND	ND	NS	(49)
		rs1061970	2	China	189	195	TaqMan	C	0,44	0,22-0,89	0,022	(48)
		rs2075559	2	China	189	195	TaqMan	G	0,38	0,16-0,91	0,029	(48)
33	COL1A2	rs760043	42	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,41	0,24-0,71	0,001	(35)
		rs42527		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,56	0,38-0,83	0,004	(35)
		rs2521205		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,49	1,11-2,00	0,01	(35)
		rs42521		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	0,66	0,48-0,91	0,01	(35)
		rs17166206		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,46	0,24-0,87	0,02	(35)
		rs6970279		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,67	0,46-0,97	0,03	(35)
		rs7788014		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,70	0,49-1,00	0,05	(35)
34	CTGF	rs928501	13	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,58	0,39-0,84	0,005	(35)
		rs4897555		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,76	1,11-2,79	0,016	(35)
35	CTLA4	1661A/G	4	China	267	282	PCR-RFLP	G	1,16	0,86-1,58	0,33	(56)
		c.75G>C	2	China	415	431	PCR-RFLP	C	1,3	1,06-1,60	ND	(55)
		+ 49G/A	1	China	205	216	PCR	AA	2,27	1,21-4,25	0,01	(57)
		318C/T	4	China	267	282	PCR-RFLP	T	1,25	0,92-1,70	0,15	(116)
		49G/A	4	China	267	282	PCR-RFLP	A	1,32	1,03-1,69	0,03	(116)
		CT60A/G	4	China	267	282	PCR-RFLP	A	1,07	0,79-1,45	0,66	(116)
		c.326G>A	2	China	415	431	PCR-RFLP	A	1,31	1,07-1,61	ND	(55)
36	CYP11B1	rs4736349	6	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,70	0,52-0,95	0,02	(35)
37	CYP11B2	rs7016924	9	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,72	0,53-0,97	0,03	(35)
38	CYP17A1	rs2486758	14	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,55	1,03-2,35	0,04	(35)
39	CYP19A1	rs28757184	82	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	2,4	1,28-4,45	0,006	(35)
		rs1902584		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,8	1,103-0,43	0,020	(35)
		rs868475		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	0,4	0,14-0,89	0,026	(35)
		rs2470150		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,4	0,18-0,95	0,038	(35)
40	DCLRE1A	rs11196524	8	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,10	(35)
41	DCLRE1B	rs1217401	10	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,09	(35)
42	DCLRE1C	rs7921238	15	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,05	(35)
43	DDB1	rs6591651	2	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,13	(35)
44	DDB2	rs4647709	11	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,16	(35)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
45	DDX1	rs2890489	14	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	G	1,49	1,11-2,01	0,009	(50)
		rs10169288		EEUU	98	69	iSelect from Illumina	G	1,49	1,10-2,01	0,01	(50)
		rs4668944		EEUU	98	69	iSelect from Illumina	A	1,41	1,05-1,89	0,02	(50)
		rs807629		EEUU	98	69	iSelect from Illumina	G	1,38	1,02-1,87	0,04	(50)
46	DMC1	rs1980455	9	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,19	(35)
47	DOCK5	rs2709618	1	EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
48	DUT	rs16960758	11	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,68	1,10-2,57	0,02	(35)
		rs8037626		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,65	1,07-2,53	0,02	(35)
		rs3784619		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,59	1,03-2,43	0,03	(35)
49	E2F1	rs6059418	3	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,07	(35)
50	EIF2AK2	rs2307466	24	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	2,00	1,18-3,39	0,01	(35)
		rs4670185		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,73	1,01-2,96	0,05	(35)
51	EME1	rs16948981	9	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,23	(35)
52	EME2	rs17135510	14	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	ND	ND	0,04	(35)
53	ER	Pvull	1	Spain	72	143	PCR-RFLP	ND	ND	ND	NS	(49)
54	ERCC1	rs3212986	2	Italia	130	250	TaqMan	ND	ND	ND	0,31	(117)
		rs11615		Italia	130	250	TaqMan	ND	ND	ND	0,37	(117)
		rs11615	11	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,18	(35)
55	ERCC2	rs11878644	9	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,07	(35)
56	ERCC3	rs3088374	17	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,07	(35)
57	ERCC4	rs1799797	30	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,65	0,46-0,94	0,02	(35)
		rs6498486		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	0,66	0,46-0,95	0,02	(35)
		rs1799801		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	0,68	0,48-0,96	0,03	(35)
		rs9646271		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,68	0,48-0,96	0,03	(35)
		rs4781563		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,68	0,48-0,97	0,03	(35)
		rs3136189		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	0,70	0,49-0,99	0,04	(35)
58	ERCC5	rs7334764	19	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,06	(35)
59	ERCC6	rs4253200	29	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,98	1,09-3,61	0,02	(35)
		rs3810944		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,62	1,02-2,57	0,04	(35)
		rs4253099		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,61	1,01-2,56	0,04	(35)
		rs4253211		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,60	1,01-2,54	0,05	(35)
60	ERCC8	rs7722373	15	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,26	(35)
61	ESR1	rs4986934	85	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	2,22	1,19-4,14	0,01	(35)
62	ESR2	rs1256064	33	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,63	1,02-2,59	0,04	(35)
63	EXO1	rs1635502	26	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,13	(35)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
64	FANCA	rs1800287	43	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,11	(35)
65	FANCC	rs10993509	26	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,07	(35)
66	FANCD2	rs7638846	7	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,08	(35)
67	FANCE	rs7739161	19	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,43	(35)
68	FANCF	rs337501	9	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,12	(35)
69	FANCG	rs10972310	11	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,80	1,02-3,17	0,04	(35)
70	FANCL	rs11894186	33	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,40	1,03-1,89	0,03	(35)
71	FANCM	rs1367580	11	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,97	1,26-3,08	0,003	(35)
		rs11845507		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,96	1,25-3,06	0,003	(35)
		rs4900664		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	2,00	1,25-3,17	0,003	(35)
		rs7141145		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,95	1,24-3,07	0,004	(35)
		rs3783702		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	2,10	1,21-3,66	0,009	(35)
		rs11157432		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,64	1,02-2,62	0,040	(35)
72	Fas	rs2234767	4	EEUU	123	510	PCR-RFLP	AA	0,8	0,20-3,80	0,88	(118)
		rs1800682		EEUU	123	510	PCR-RFLP	GG	1,3	0,7-2,2	NS	(118)
		Fas exon 3		EEUU	123	510	PCR-RFLP	AG	1,8	1,1-3,0	0,028	(118)
		Fas exon 7		EEUU	123	510	PCR-RFLP	TT	0,7	0,3-1,8	0,932	(118)
73	FEN1	rs695867	10	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,13	(35)
74	FGF2	rs11737764	22	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	2,12	1,33-3,39	0,002	(35)
	FGF2	rs1137764	1	Rusia	24	96	MALDI-TOF minisequencing	T	ND	ND	NS	(36)
	FGF2	rs3789138	22	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,37	1,02-1,83	0,037	(35)
	FGF2	rs3804158		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,35	1,01-1,82	0,04	(35)
75	FGFR1	rs6983315	14	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,68	0,50-0,93	0,02	(35)
76	FGFR2	rs3135819	40	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,32	0,13-0,79	0,01	(35)
		rs3750815		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,75	1,10-2,76	0,02	(35)
		rs12572779		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,42	1,04-1,94	0,03	(35)
		rs2247088		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,58	1,04-2,40	0,03	(35)
77	FGFR3	rs6599400	3	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,51	1,12-2,03	0,007	(35)
78	FGFR3	rs6599400	1	Russia	24	96	MALDI-TOF minisequencing	A	ND	ND	0,02	(36)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
79	FLJ35220	rs8065843	17	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,56	0,38-0,83	0,004	(35)
		rs12938834		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,62	0,44-0,87	0,006	(35)
		rs4603608		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,49	1,11-2,00	0,007	(35)
		rs4491586		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	0,60	0,41-0,88	0,009	(35)
		rs4074303		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,55	0,35-0,86	0,009	(35)
		rs4074302		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	0,59	0,37-0,92	0,02	(35)
		rs4424945		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,55	1,02-2,34	0,04	(35)
80	FOSL1	rs694994	3	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	0,61	0,38-0,98	0,04	(35)
		rs568617		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,61	0,38-0,98	0,041	(35)
81	FRS2	rs12371904	11	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,59	0,37-0,93	0,02	(35)
82	GC	rs705117	17	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	0,50	0,28-0,87	0,02	(35)
		rs1155563		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,39	1,02-1,89	0,04	(35)
83	GDF2	rs9421731	19	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,46	1,07-2,00	0,02	(35)
		rs7093975		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,43	1,03-1,98	0,03	(35)
		rs2125064		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,39	1,02-1,89	0,03	(35)
		rs743509		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,37	1,01-1,84	0,04	(35)
84	GH1	rs7921	3	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,52	0,35-0,76	0,001	(35)
		rs7921	1	Russia	24	96	MALDI-TOF minisequencing	A	ND	ND	NS	(36)
		rs6171	2	EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs11079515	3	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,61	1,20-2,16	0,002	(35)
85	GHR	rs2940927	7	EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs1876790		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs7735889		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs6179		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs6182		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs6180		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs6184		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
86	GHRL	rs26802	19	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,38	1,01-1,90	0,04	(35)
87	GLI1	ND	9	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,26	(35)
88	GNRH1	rs6185	1	EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
89	GNRH2	rs3761243	15	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,60	1,19-2,16	0,002	(35)
		rs3761243	1	Russia	24	96	MALDI-TOF minisequencing	C	ND	ND	NS	(36)
		rs6076466	15	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,41	1,03-1,92	0,030	(35)
90	GNRHR	rs13138607	7	EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs4986942		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs10031252		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs3822196		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs3796718		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs1843593		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs2630488		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
91	GRM4	rs7591996	4	China	168	216	PCR	ND	ND	ND	ND	(119)
		rs10208273		China	168	216	PCR	ND	ND	ND	0.823	(119)
		rs17206779		China	168	216	PCR	ND	ND	ND	0.837	(119)
		rs1906953		China	168	216	PCR	T	1,57	2,09-1,18	0,002	(119)
92	GST	GSTM1	1	China	124	241	Taqman	non-null	1,46	0,90-2,37	ND	(120)
		GSTT1	1	China	124	241	Taqman	non-null	1,81	1,11-2,98	ND	(120)
93	GTF2H1	rs4150674	15	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,09	(35)
94	GTF2H3	rs1050448	19	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,08	(35)
95	GTF2H4	rs1264320	14	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,71	0,52-0,97	0,03	(35)
		rs9378150		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	ND	ND	0,04	(35)
96	GTF2H5	rs2363781	9	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,42	(35)
97	HEL308	rs11940490	9	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,07	(35)
98	HSD17B1	rs676387	8	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,64	0,44-0,92	0,02	(35)
		rs2676530		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,39	1,02-1,90	0,04	(35)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
99	HSD17B2	rs8045494	84	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	ND	ND	0,004	(35)
		rs16956406		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	ND	ND	0,01	(35)
		rs16956238		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	ND	ND	0,02	(35)
		rs16956274		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	ND	ND	0,02	(35)
		rs7192075		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	ND	ND	0,02	(35)
		rs8049423		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	ND	ND	0,02	(35)
		rs8058561		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	ND	ND	0,02	(35)
		rs4404064		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,79	1,07-3,00	0,03	(35)
		rs11648233		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,37	1,02-1,84	0,03	(35)
		rs11150436		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	ND	ND	0,03	(35)
		rs8191167		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	ND	ND	0,03	(35)
		rs8052451		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	ND	ND	0,04	(35)
		rs8059915		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,36	1,02-1,83	0,04	(35)
		rs13337293		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	ND	ND	0,04	(35)
		rs8048090		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	ND	ND	0,04	(35)
rs16956419	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	ND	ND	0,05	(35)			
100	HSD17B3	rs12552648	49	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,84	1,03-3,28	0,04	(35)
		rs8190534		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,63	0,39-0,99	0,05	(35)
101	HUS1	rs3176580	14	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,1	(35)
102	ID2	rs4669330	3	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,1	(35)
103	IFNA1	rs1332179	7	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	ND	ND	ND	(111)
		rs1591033		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,00	ND	1,0	(111)
		rs10811542		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,60	ND	0,2	(111)
		rs1929977		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	ND	ND	ND	(111)
		rs1854696		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,98	ND	0,9	(111)
		rs1332190		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,99	ND	0,9	(111)
		rs7864960		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,97	ND	0,8	(111)
104	IFNA10	rs2007448	2	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,91	ND	0,7	(111)
		rs4977686		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	1,05	ND	0,7	(111)
105	IFNA14	rs10811518	3	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	1,24	ND	0,3	(111)
		rs1330320		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,02	ND	0,9	(111)
		rs1330317		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,91	ND	0,7	(111)
106	IFNA16	rs7033839	2	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,99	ND	1,0	(111)
		rs10964912		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,18	ND	0,3	(111)
107	IFNA17	rs6475526	1	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	0,98	ND	0,9	(111)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
108	IFNA2	rs7025293	7	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	0,74	ND	0,4	(111)
		rs7034410		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,94	ND	0,8	(111)
		rs647167		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,05	ND	0,8	(111)
		rs615544		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,92	ND	0,8	(111)
		rs624704		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,88	ND	0,5	(111)
		rs10120977		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,15	ND	0,5	(111)
		rs632941		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,88	ND	0,5	(111)
109	IFNA21	rs7037868	4	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,11	ND	0,5	(111)
		rs7041635		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,91	ND	0,7	(111)
		rs10964880		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,17	ND	0,4	(111)
		rs2019226		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,95	ND	0,8	(111)
110	IFNA5	rs12156640	3	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,51	ND	0,1	(111)
		rs1330313		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,88	ND	0,6	(111)
		rs12341875		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,25	ND	0,2	(111)
111	IFNA6	rs10119678	3	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,84	ND	0,5	(111)
		rs597408		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,07	ND	0,8	(111)
		rs2480927		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	0,86	ND	0,5	(111)
112	IFNA8	rs1224391	11	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	1,13	ND	0,4	(111)
		rs16938384		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,63	ND	0,2	(111)
		rs4978113		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,00	ND	1,0	(111)
		rs4978114		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,17	ND	0,5	(111)
		rs10757219		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,93	ND	0,7	(111)
		rs4978115		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,93	ND	0,6	(111)
		rs10811537		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,01	ND	1,0	(111)
		rs1332180		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,66	ND	0,3	(111)
		rs7025006		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,96	ND	0,8	(111)
		rs2104880		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	1,56	ND	0,1	(111)
		rs1888889		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	ND	ND	ND	(111)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
113	IFNB1	rs10964823	19	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	0,93	ND	0,6	(111)
		rs4977657		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,05	ND	0,8	(111)
		rs1539746		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	ND	ND	ND	(111)
		rs10435777		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	1,00	ND	1,0	(111)
		rs967102		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,01	ND	0,9	(111)
		rs1051922		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	1,01	ND	1,0	(111)
		rs10964831		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	0,85	ND	0,5	(111)
		rs1424855		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,00	ND	1,0	(111)
		rs9333358		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,00	ND	1,0	(111)
		rs12156577		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,91	ND	0,8	(111)
		rs7033217		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,92	ND	0,7	(111)
		rs10811467		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,86	ND	0,5	(111)
		rs10757181		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,96	ND	0,8	(111)
		rs12684687		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	1,02	ND	0,9	(111)
		rs17692260		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,93	ND	0,8	(111)
		rs10964832		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,82	ND	0,4	(111)
		rs10757182		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,94	ND	0,7	(111)
		rs10964833		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,95	ND	0,8	(111)
		rs17754055		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	1,13	ND	0,5	(111)
114	IFNE1	rs1412395	5	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,89	ND	0,5	(111)
		rs4246868		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,83	ND	0,2	(111)
		rs1125488		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,66	ND	0,3	(111)
		rs10965040		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,90	ND	0,7	(111)
		rs10811554		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,06	ND	0,7	(111)
115	IFNK	rs2166128	8	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	0,74	ND	0,33	(111)
		rs10812605		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,01	ND	0,94	(111)
		rs12553951		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,95	ND	0,88	(111)
		rs2814708		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,01	ND	0,94	(111)
		rs11792285		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	1,01	ND	0,96	(111)
		rs4879540		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,90	ND	0,48	(111)
		rs903603		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	1,05	ND	0,74	(111)
		rs10812610		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,91	ND	0,55	(111)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
116	IFNW1	rs2113716	12	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,92	ND	0,72	(111)
		rs12236000		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,15	ND	0,62	(111)
		rs10118667		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,92	ND	0,64	(111)
		rs10118669		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	0,99	ND	0,93	(111)
		rs17692502		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,11	ND	0,53	(111)
		rs10757190		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,94	ND	0,71	(111)
		rs2081381		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,93	ND	0,63	(111)
		rs10964862		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	1,15	ND	0,35	(111)
		rs10964863		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	0,99	ND	0,94	(111)
		rs10811482		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,11	ND	0,56	(111)
		rs4977976		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,07	ND	0,77	(111)
		rs10757193		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,94	ND	0,66	(111)
117	IGF1	rs7956547	9	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	0,53	0,36-0,79	0,002	(35)
		rs7956547	1	Russia	24	96	MALDI-TOF minisequencing	C	ND	ND	NS	(36)
		rs2162679	4	EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs1019731		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs2288378		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs2288378		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,69	0,48-0,99	0,04	(35)
		rs6220		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs5742714		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,34	0,16-0,70	0,004	(35)
		rs10860864		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,46	0,27-0,78	0,004	(35)
		rs17796225		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	0,57	0,39-0,83	0,004	(35)
		rs5742692		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	ND	ND	0,01	(35)
		rs10860869		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,64	0,44-0,93	0,02	(35)
		rs9651925		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,65	0,46-0,93	0,02	(35)
		rs2195240		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,68	0,47-0,99	0,05	(35)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
118	IGF1R	rs2684806	4	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,45	1,08-1,93	0,01	(35)
		rs907806	11	EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs2684777		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,68	1,11-2,54	0,01	(35)
		rs4966017		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,39	0,16-0,97	0,04	(35)
		rs1546713		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,36	1,01-1,84	0,04	(35)
		rs9282718		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs2137680		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs2175795		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs3743258		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs3743259		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs2272037		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs2229765		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs2016347	EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)	
		rs9282715	EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)	
119	IGF2	rs3213216	4	EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs3213221		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs3213223		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs734351		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
120	IGF2BP2	rs9850770	1	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,59	0,36-0,95	0,03	(35)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
121	IGF2R	rs2282141	6	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,65	0,47-0,89	0,008	(35)
		rs1003737	1	EEUU	290	NA	Sequenom platform Iplex Gold	ND	0,91	ND	<0,0001	(44)
		rs1570070	20	EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	0,84	(45)
		rs9456484		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,39	0,19-0,82	0,01	(35)
		rs384167		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,64	1,08-2,51	0,02	(35)
		rs2297372		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	0,66	0,46-0,95	0,02	(35)
		rs12202350		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,72	1,08-2,75	0,02	(35)
		rs600324		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,63	1,03-2,56	0,04	(35)
		rs894817		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	1,0	(45)
		rs998075		EEUU	104	74	ABI sequencer	GG	2,27	1,12-4,58	0,02	(45)
		rs998074		EEUU	104	74	ABI sequencer	CC	2,29	1,14-4,60	0,02	(45)
		rs629849		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	0,1	(45)
		rs2282140		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	0,07	(45)
		rs1803989		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	0,35	0,13-0,98	0,044	(45)
		rs9456497		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs4709390		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs4709392		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs435612		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs687088		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs416572		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
rs648253	EEUU	104		74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)		
rs4709393	EEUU	104		74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)		
rs3777411	EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)			
rs7746102	EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)			
rs2065396	EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)			
rs3798180	EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)			
122	IGFALS	rs2575352	1	EEUU	290	NA	Sequenom platform Iplex Gold	ND	2,62	ND	<0,0001	(44)
		rs9282731	4	EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs2230053		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs17559		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs3751893		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
123	IGFBP2	rs9341105	2	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,49	1,09-2,04	0,01	(35)
		rs12694392		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,57	0,35-0,91	0,020	(35)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
124	IGFBP3	rs6953668	3	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	ND	ND	0,009	(35)
		rs2471551		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs9282734		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
		rs6413441		EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
125	IGFBP5	rs7420849	1	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,36	1,01-1,84	0,04	(35)
		rs2067039	1	EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
126	IL-10	1082A	1	Brazil	80	160	PCR-RFLP	ND	ND	ND	ND	(121)
127	IL-12A	rs568408	2	China	106	72	PCR-RFLP	GA	1,86	1,11-3,12	ND	(122)
		rs2243115		China	106	72	PCR-RFLP	GG	0,49	0,05-4,46		(122)
128	IL-12B	rs3212227	1	China	106	72	PCR-RFLP	CC	2,7	1,38-5,28	ND	(122)
129	IL-1B	31T/C	3	China	120	120	PCR-RFLP	CC	0,4	0,17-0,92	0,03	(123)
		511C/T		China	120	120	PCR-RFLP	TT	0,4	0,17-0,95	0,04	(123)
		3954C/T		China	120	120	PCR-RFLP	TT	1,48	0,60-3,67	0,4	(123)
130	IL-6	174G>C	1	Brazil	80	160	PCR-RFLP	ND	ND	ND	ND	(121)
131	IL-27	IL-27 -964	3	China	160	250	PCR-RFLP	ND	ND	ND	ND	(124)
		IL-27 2905		China	160	250	PCR-RFLP	ND	ND	ND	0,897	(124)
		IL-27 4730		China	160	250	PCR-RFLP	ND	ND	ND	0,819	(124)
132	ITGA3	rs2230392	3	China	118	126	TaqMan	AA	2,34	1,18-4,64	ND	(125)
		rs2285524		China	118	126	TaqMan	AA	1,3	0,66-2,57	ND	(125)
		rs16948627		China	118	126	TaqMan	AC	4,96	2,42-10,18	ND	(125)
133	KCTD9	rs1812594	1	EEUU	104	74	ABI sequencer	ND	ND	ND	NS	(45)
134	KLHL9	rs913931	2	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,84	ND	0,50	(111)
		rs8729		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	0,87	ND	0,55	(111)
135	LHCGR	rs6711321	74	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,55	0,35-0,86	0,01	(35)
		rs7371084		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	0,51	0,29-0,88	0,02	(35)
		rs12618729		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,56	0,32-0,97	0,04	(35)
		rs274875		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	ND	ND	0,02	(35)
136	LIG1	rs3730872	31	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,5	0,24-0,92	0,028	(35)
		rs3730912		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,5	0,27-0,93	0,029	(35)
		rs380359		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,9	1,05-3,47	0,034	(35)
		rs3786763		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,5	0,28-0,96	0,037	(35)
		rs931196		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	ND	ND	0,05	(35)
137	LIG3	rs931196	20	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	ND	ND	0,05	(35)
138	LIG4	rs9670655	20	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,06	(35)
139	LIPE	rs11673645	1	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,24	(35)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
140	LOC101930033	rs896324	2	EEUU	99	1365	iSelect from Illumina	AG	1,79	1,08–2,97	0,03	(114)
		rs185852		EEUU	99	1365	iSelect from Illumina	AA	2,28	1,04–5,02	0,04	(114)
141	LOX	22 G/C	3	China	326	433	Sequencing	C	3,88	1,94-27,78	0,00004	(126)
		225 C/G		China	326	433	Sequencing	G	0,86	0,40-21,84	0,7	(126)
		473 G/A		China	326	433	PCR-RFLP	A	1,38	1,07-21,78	0,01	(126)
142	MAD2L2	rs6694489	12	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,66	1,02-2,71	0,04	(35)
143	MAPK7	rs2048230	3	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,41	(35)
144	MBD4	rs12485319	11	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,59	0,35-1,00	0,05	(35)
145	MCM4	ND	3	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
146	MDM2	c.44C>T	2	China	415	431	CRS-PCR	T	1,36	1,11-1,67	0,003	(54)
		c.1002T>C		China	415	431	PCR-RFLP	C	1,27	1,02-1,56	0,03	(54)
		rs1690916	9	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,62	0,45-0,85	0,003	(35)
		rs1690916	1	Russia	24	96	MALDI-TOF minisequencing	A	ND	ND	NS	(36)
		rs2279744	1	Italy	201	250	Pyrosequencing	GG	2,09	1,15-3,78	0,003	(33)
		rs2279744	4	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,31	0,96-1,78	0,09	(35)
		rs2279744	1	Australia	17	37	Taqman	G	1,46	0,56-3,71	0,39	(34)
		rs1196334	9	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,78	1,16-2,72	0,008	(35)
rs1695147	EEUU	96		1426	iSelect from Illumina	G	1,75	1,14-2,67	0,010	(35)		
rs1846402	EEUU	96		1426	iSelect from Illumina	A	1,63	1,07-2,49	0,023	(35)		
147	MEN1	ND	8	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
148	MGMT	rs10829619	77	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,62	0,45-0,84	0,002	(35)
		rs11592922		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,62	0,46-0,85	0,003	(35)
		rs10741191		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,44	1,07-1,94	0,016	(35)
		rs2026975		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,65	0,45-0,94	0,022	(35)
		rs11016811		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,39	1,01-1,93	0,044	(35)
149	MLH1	rs1800734	17	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,17	(35)
150	MLH3	rs10142770	10	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,51	(35)
151	MMS19L	rs17112809	17	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,08	(35)
152	MNAT1	rs4151225	26	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,09	(35)
153	MPG	rs216614	13	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	4,80	ND	0,004	(35)
		rs1013358		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,61	1,05-2,49	0,030	(35)
		rs2288490		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,70	0,50-0,97	0,035	(35)
		rs1045001		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,57	1,03-2,40	0,035	(35)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
154	MPO	463A>G	1	Brazil	80	160	PCR-RFLP	ND	ND	ND	ND	(121)
155	MRE11A	ND	34	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
		rs10831225	26	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	NA	NA	NA	0,0936	(35)
156	MSH2	rs2042649	27	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,07	(35)
157	MSH3	rs245407	41	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,08	(35)
158	MSH4	rs11161848	24	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,42	1,05-1,93	0,02	(35)
		rs946163		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,40	1,04-1,90	0,03	(35)
		rs11161887		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,38	1,03-1,86	0,03	(35)
159	MSH5	rs6905572	18	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,1	(35)
160	MSH6	rs6742522	20	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,2	(35)
161	MTAP	rs12378701	17	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	0,59	ND	0,1	(111)
		rs7865829		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,18	ND	0,5	(111)
		rs10757257		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,80	ND	0,15	(111)
		rs2039971		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	ND	ND	ND	(111)
		rs7023329		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	1,26	ND	0,1	(111)
		rs7027989		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	1,25	ND	0,1	(111)
		rs1544195		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,91	ND	0,8	(111)
		rs7874112		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,08	ND	0,8	(111)
		rs10811629		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,78	ND	0,1	(111)
		rs4478653		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,02	ND	0,9	(111)
		rs10965163		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	0,95	ND	0,9	(111)
		rs3935920		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	A	0,93	ND	0,8	(111)
		rs4977734		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	C	1,01	ND	1,0	(111)
		rs7871127		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	T	1,19	ND	0,6	(111)
		rs7047648		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	1,09	ND	0,6	(111)
		rs10811631		EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,93	ND	0,7	(111)
rs3802394	EEUU	96	1428	Illumina SNParray	G	0,89	ND	0,6	(111)			
162	MTHFR	rs1801133	1	Turkey	44	44	PCR-RFLP	ND	ND	ND	ND	(127)
163	MUS81	rs11227332	6	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,06	(35)
164	MUTYH	rs7535487	9	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,13	(35)
165	MYC	ND	26	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
166	NBN	rs1805794	4	China	120	120	PCR-RFLP	GC+CC	0,42	0,19–0,94	0,04	(52)
		rs1805794	21	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
		rs1805794	4	Slovenia	120	120	PCR-RFLP	GC+CC	0,42	0,19–0,94	0,04	(52)
		rs709816		Slovenia	120	120	PCR-RFLP	CT+TT	0,99	0,53–1,84	1,0	(52)
		rs1063054		Slovenia	120	120	PCR-RFLP	AC+CC	0,81	0,44–1,51	0,5	(52)
rs13312970	21	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	NA	NA	NA	0,3	(35)		
167	NEIL1	rs11072542	4	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,39	1,01-1,90	0,04	(35)
168	NEIL2	rs8191604	42	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,61	0,41-0,90	0,01	(35)
		rs17754589		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,56	0,35-0,90	0,02	(35)
169	NEIL3	ND	44	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,07	(35)
170	NHEJ1	ND	12	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,13	(35)
171	NOG	rs16957413	9	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,50	0,27-0,90	0,02	(35)
		rs17822219		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,39	1,03-1,88	0,031	(35)
172	NOLA1	ND	11	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
173	NOLA2	ND	6	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
174	NOLA3	rs17236875	15	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	C	1,62	1,03-2,56	0,04	(50)
		rs2279686		EEUU	98	69	iSelect from Illumina	C	1,36	1,02-1,83	0,04	(50)
		rs7162607		EEUU	98	69	iSelect from Illumina	A	0,74	0,55-0,99	0,04	(50)
175	NTHL1	ND	22	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,09	(35)
176	NUDT1	ND	13	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,11	(35)
177	OGG1	ND	11	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,34	(35)
178	p53	rs8079544	12	EEUU	104	74	Taqman	ND	ND	ND	0,35	(53)
		rs1042522	1	Italy	201	250	Pyrosequencing	Arg/Pro	0,48	0,30-0,77	0,002	(33)
		rs1042522	12	EEUU	104	74	Taqman	ND	ND	ND	0,69	(53)
		ND	6	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,13	(35)
		rs1642785	12	EEUU	104	74	Taqman	ND	ND	ND	0,81	(53)
		rs9895829		EEUU	104	74	Taqman	ND	ND	ND	0,49	(53)
		rs2909430		EEUU	104	74	Taqman	ND	ND	ND	0,97	(53)
		rs1800372		EEUU	104	74	Taqman	ND	ND	ND	0,19	(53)
		rs1625895		EEUU	104	74	Taqman	ND	ND	ND	0,77	(53)
		rs12947788		EEUU	104	74	Taqman	ND	ND	ND	0,51	(53)
		rs1614984		EEUU	104	74	Taqman	ND	ND	ND	0,32	(53)
rs9894946	EEUU	104		74	Taqman	ND	ND	ND	0,35	(53)		
rs3219123	24	EEUU		96	1426	iSelect from Illumina	A	0,28	0,09-0,90	0,03	(35)	
rs3219123	25	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	A	0,28	0,09-0,89	0,03	(50)		

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
180	PARP2	rs3093938	27	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	ND	ND	0,004	(35)
		rs3093938	31	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	G	2,4x1010	0-inf	0,004	(50)
		rs10147163	31	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	C	1,41	1,03-1,92	0,03	(50)
		rs10147163	27	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,41	1,03-1,92	0,03	(35)
		rs3093919	27	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	ND	ND	0,01	(35)
		rs3093919	31	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	G	31,07	2,78-347,8	0,01	(50)
		rs11622655	27	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,40	1,03-1,92	0,03	(35)
		rs11622655	31	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	G	1,4	1,02-1,92	0,03	(50)
		rs3093942	27	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,5	1,01-2,31	0,05	(35)
		rs3093942	31	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	C	1,53	1,01-2,31	0,05	(50)
		rs4981998	27	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,38	1,00-1,90	0,05	(35)
		rs4981998	31	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	T	1,38	1,00-1,90	0,05	(50)
181	PARP3	ND	2	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,70	(35)
182	PARP4	rs12863638	29	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,6	0,40-0,87	0,01	(35)
		rs9511308		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,6	0,4-0,89	0,01	(35)
		rs1807271		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,6	1,07-2,48	0,02	(35)
		rs750391		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,7	0,50-0,96	0,03	(35)
		rs4770687		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,7	0,54-1,00	0,05	(35)
183	PCNA	ND	9	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,14	(35)
184	PECAM-1	125C>G	1	Brazil	80	160	PCR-RFLP	ND	ND	ND	ND	(121)
185	PIK3C3	ND	12	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
		rs7646409	1	China	59	63	TaqMan	CC	3,47	1,26-9,56	ND	(112)
186	PINX1	ND	39	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
187	PLAA	rs4977722	14	EEUU	96	1428	llumina SNParray	G	1,17	ND	0,3	(111)
		rs10967588		EEUU	96	1428	llumina SNParray	T	1,42	ND	0,2	(111)
		rs7860542		EEUU	96	1428	llumina SNParray	A	ND	ND	ND	(111)
		rs1336338		EEUU	96	1428	llumina SNParray	G	ND	ND	ND	(111)
		rs4977723		EEUU	96	1428	llumina SNParray	A	0,9	ND	0,7	(111)
		rs16910873		EEUU	96	1428	llumina SNParray	G	0,8	ND	0,5	(111)
		rs7871286		EEUU	96	1428	llumina SNParray	T	0,8	ND	0,4	(111)
		rs10120342		EEUU	96	1428	llumina SNParray	G	1,1	ND	0,5	(111)
		rs12003612		EEUU	96	1428	llumina SNParray	T	0,9	ND	0,7	(111)
		rs7039400		EEUU	96	1428	llumina SNParray	A	1,2	ND	0,5	(111)
		rs3758218		EEUU	96	1428	llumina SNParray	A	0,9	ND	0,7	(111)
		rs7020010		EEUU	96	1428	llumina SNParray	A	ND	ND	ND	(111)
		rs10967624		EEUU	96	1428	llumina SNParray	A	1,5	ND	0,1	(111)
		rs10967627		EEUU	96	1428	llumina SNParray	C	ND	ND	ND	(111)
188	PMP22	ND	13	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,1	(35)
189	PMS1	ND	16	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,06	(35)
190	PMS2	ND	21	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,07	(35)
191	PMS2L3	rs1167795	15	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,72	0,53-0,97	0,03	(35)
192	PNKP	rs2305922	12	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,70	0,51-0,95	0,02	(35)
193	POLB	ND	13	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,55	(35)
194	POLD1	ND	10	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,05	(35)
195	POLE	ND	21	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,07	(35)
196	POLG	ND	22	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,11	(35)
197	POLH	ND	6	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,65	(35)
198	POLI	ND	7	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,09	(35)
199	POLK	rs979182	16	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,54	0,29-0,10	0,05	(35)
200	POLL	rs10883663	13	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,43	1,06-1,93	0,02	(35)
		rs11191064		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,71	1,07-2,74	0,03	(35)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
201	POLM	rs6955679	11	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,50	0,28-0,88	0,02	(35)
		rs3218655		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,5	0,31-0,93	0,03	(35)
		rs4640970		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,4	1,02-1,86	0,04	(35)
202	POLN	ND	31	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,09	(35)
203	POLQ	rs4676727	26	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,58	0,34-0,97	0,04	(35)
204	PON1	rs662	2	China	50	50	PCR-RFLP	R	2,74	1,20-6,23	0,02	(128)
		rs854560		China	50	50	PCR-RFLP	L	0,14	0,04-0,50	0,001	(128)
205	POT1	rs727505	7	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	A	0,7	0,49-0,99	0,05	(50)
206	PRKDC	ND	15	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
		rs8178179	14	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	NA	NA	NA	0,15	(35)
207	PTEN	rs478839	15	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,64	0,47-0,88	0,01	(35)
		rs9783238		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	ND	ND	0,02	(35)
208	RAD1	rs2069478	11	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,20	(35)
209	RAD17	rs4976162	9	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,17	(35)
210	RAD18	rs615967	14	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,18	(35)
211	RAD23A	rs2974754	6	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,15	(35)
212	RAD23B	rs10978792	27	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,12	0,02-0,88	0,04	(35)
		rs11573709		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,53	1,11-2,11	0,010	(35)
213	RAD50	ND	29	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
		rs11955168	14	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	NA	NA	NA	0,2	(35)
214	RAD51	rs1801320	3	Eslovenia	120	120	PCR-RFLP	GC+CC	0,65	0,26-1,58	0,34	(52)
		rs1801320	11	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,07	(35)
		rs1801321	3	Eslovenia	120	120	PCR-RFLP	GT+TT	0,92	0,50-1,72	0,8	(52)
		rs12593359		Eslovenia	120	120	PCR-RFLP	TG+GG	1,14	0,57-2,29	0,7	(52)
215	RAD51AP1	ND	15	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
216	RAD51C	ND	8	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
		rs302864	7	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	NA	NA	NA	0,3260	(35)
217	RAD51L3	ND	21	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
218	RAD52	rs17833575	29	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,10	(35)
219	RAD54B	rs3136405	27	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	ND	ND	0,03	(35)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
220	RAD54L	ND	14	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
		rs17102098	11	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	NA	NA	NA	0,1	(35)
221	RAD9A	ND	7	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,2	(35)
222	RB1	ND	21	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,07	(35)
223	RBAK	rs6971796	7	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(35)
224	RDM1	rs2735482	12	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(35)
225	RECQL	ND	30	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
		rs1061626	30	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	NA	NA	NA	0,09	(35)
226	RECQL4	ND	9	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
		G1814A	2	Japan	71	82	PCR-RFLP	ND	ND	ND	NS	(51)
		C2474T		Japan	71	82	PCR-RFLP	NA	NA	ND	NS	(51)
		rs4251689	7	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	NA	NA	NA	0,26	(35)
227	RECQL5	ND	7	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
		rs820151		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	NA	NA	NA	0,29	(35)
228	REV1	rs12479064	10	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,08	(35)
229	REV3L	rs11755082	21	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,13	(35)
230	RPA1	rs8067195	32	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,77	1,11-2,84	0,02	(35)
231	RPA2	ND	12	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,06	(35)
232	RPA3	rs2024374	40	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,02	(35)
233	RPS24	rs11002385	3	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,69	0,49-0,95	0,03	(35)
234	RPS6	rs7048650	6	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,68	0,47-1,00	0,05	(35)
235	RRM2B	rs2853229	21	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,08	(35)
236	RTEL1	ND	16	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
237	RXRB	rs383711	13	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,84	1,10-3,08	0,02	(35)
238	SHFM1	rs6968090	13	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,30	(35)
239	SMUG1	rs3136386	13	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,18	(35)
240	SPO11	rs6070061	10	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,13	(35)
241	SQSTM1	rs515110	15	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	2,05	1,02-4,10	0,04	(35)
242	SRD5A2	rs6732223	28	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,37	1,02-1,85	0,04	(35)
243	TDG	rs4135128	34	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	0,40	0,19-0,84	0,02	(35)
244	TDP1	rs8010627	24	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,96	1,10-3,51	0,02	(35)
245	TEP1	rs2104977	41	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	A	1,56	1,02-2,40	0,04	(50)
246	TERC	ND	7	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
247	TERF1	rs2306492	22	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	A	0,48	0,33-0,69	0,0001	(50)
		rs9298211		EEUU	98	69	iSelect from Illumina	T	0,5	0,34-0,72	0,0003	(50)
		rs2306494		EEUU	98	69	iSelect from Illumina	G	0,51	0,35-0,74	0,0003	(50)
		rs2929585		EEUU	98	69	iSelect from Illumina	G	0,52	0,36-0,75	0,0005	(50)
		rs2929586		EEUU	98	69	iSelect from Illumina	G	0,52	0,36-0,75	0,0005	(50)
		rs2929593		EEUU	98	69	iSelect from Illumina	T	0,52	0,36-0,75	0,0005	(50)
		rs7001277		EEUU	98	69	iSelect from Illumina	A	0,53	0,37-0,76	0,0006	(50)
		rs3116136		EEUU	98	69	iSelect from Illumina	C	1,42	1,04-1,94	0,028	(50)
		rs6990223		EEUU	98	69	iSelect from Illumina	T	2,72	1,02-7,27	0,047	(50)
248	TERF2	ND	9	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
249	TERF2IP	ND	9	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
250	TERT	rs4073918	16	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	C	1,51	1,11-2,07	0,01	(50)
251	TGFA	rs559567	45	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	0,51	0,27-0,94	0,03	(35)
252	TGFBR1	Int7G24A	2	China	168	168	PCR-RFLP	AA	2,89	1,46-4,92	0,001	(129)
		rs10819639	18	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,13	(35)
		rs11466445	2	China	168	168	PCR+ABI Sequencer	6A/6A	4,59	2,33-7,97	0,0018	(129)
		rs1800469	2	China	202	216	ND	ND	ND	ND	ND	(46)
		rs1800470		China	202	216	ND	ND	2,28	1,30-3,98	p<0,001	(46)
253	TINF2	rs2748516	14	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	A	2,01	1,18-3,41	0,01	(50)
254	TNF-alpha	308G>A	1	Brazil	80	160	PCR-RFLP	ND	ND	ND	ND	(121)
		rs1800629	2	Spain	126	222	PCR-DGGE	A	0,94	0,48-1,83	0,85	(130)
		rs361525		Spain	126	222	PCR-DGGE	A	0,18	0,042- 0,8	0,012	(130)
255	TNF-beta	252A>G	1	Brazil	80	160	PCR-RFLP	ND	ND	ND	ND	(121)
256	TNFRSF11A	rs4941129	40	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	0,62	0,43-0,88	0,008	(35)
		rs2981006		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	0,637904	0,44-0,92	0,01	(35)
		rs884205		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	0,671758	0,46-0,97	0,04	(35)
		rs7239261		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,342512	1,00-1,79	0,05	(35)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
267	UGT1A8	rs7556676	12	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,41	1,05-1,89	0,02	(35)
		rs3806597		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,40	1,04-1,87	0,03	(35)
		rs871514		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,40	1,04-1,87	0,03	(35)
		rs10179091		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,39	1,04-1,86	0,03	(35)
		rs4294999		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,39	1,04-1,87	0,03	(35)
		rs3755319		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,38	1,02-1,85	0,03	(35)
		rs4663963		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,37	1,02-1,84	0,04	(35)
		rs17862866		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,37	1,02-1,84	0,04	(35)
		rs2741042		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,36	1,01-1,84	0,04	(35)
		rs17863803		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	ND	ND	0,04	(35)
		rs4663969		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	1,35	1,00-1,81	0,05	(35)
		rs2741048		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	0,72	0,52-1,00	0,05	(35)
268	UNG	rs34260	15	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,27	(35)
269	VDR	FokI	3	Spain	72	143	PCR-RFLP	Ff	ND	ND	0,05	(49)
		Apal		Spain	72	143	PCR-RFLP	NA	NA	ND	NS	(49)
		TaqI		Spain	72	143	PCR-RFLP	NA	NA	ND	NS	(49)
270	VEGF	634G>C	3	China	330	342	PCR-RFLP	C	1,05	0,84-1,30	ND	(131)
		936C>T		China	330	342	PCR-RFLP	T	1,31	1,02-1,68	ND	(131)
		1612G>A		China	330	342	PCR-RFLP	A	0,96	0,78-1,19	ND	(131)
271	VEGFA	rs833061	26	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	C	1,37	1,01-1,85	0,05	(35)
272	WRN	ND	28	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
		rs13278463	25	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	NA	NA	NA	0,0813	(35)
273	XAB2	rs4804756	14	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,19	(35)
274	XPA	rs10817938	14	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,08	(35)
275	XPC	rs3731143	37	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,05	(35)
276	XPD	rs13181	2	Italy	130	250	TaqMan	ND	ND	ND	0,11	(117)
277	XPG	rs17655		Italy	130	250	TaqMan	ND	ND	ND	ND	(117)
278	XRCC1	rs2023614	20	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,11	(35)
279	XRCC2	rs13232006	15	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,27	(35)
280	XRCC3	rs861539	2	Slovenia	79	373	KASPAS assay	CT+TT	0,54	0,30-0,99	0,05	(52)
		rs3212092	21	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	A	ND	ND	0,01	(35)
		rs1799794	2	Slovenia	79	373	KASPAS assay	AG+GG	1,53	0,83-2,80	0,175	(52)
281	XRCC4	rs2619778	62	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	0,06	(35)

Tabla anexa 1. Polimorfismos analizados en estudios de asociación de genes candidato de la susceptibilidad del OS (continúa).

N	Genes	SNP	N SNPs estudiados	Origen	N casos	N controles	Metodo	Alelo/Genotipo	OR	IC95%	P valor	Referencia
282	XRCC5	rs16855552	48	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	2,1	1,32-3,27	0,002	(35)
		rs2241320		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	2,1	1,31-3,25	0,002	(35)
		rs828918		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	G	1,8	1,17-2,79	0,007	(35)
		rs207876		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,4	1,06-1,92	0,02	(35)
		rs16855489		EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	T	1,4	1,05-1,89	0,022	(35)
283	XRCC6	ND	15	EEUU	98	69	iSelect from Illumina	ND	ND	ND	ND	(50)
		rs132767	8	EEUU	96	1426	iSelect from Illumina	GT	0,63	0,40-0,99	0,05	(35)

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El OS es el tumor óseo más común en jóvenes. Su inicio en edades tempranas apunta a que en su origen, existe un importante componente genético. Diversos estudios han sugerido que la susceptibilidad a desarrollar OS podría ser debido a pequeñas variantes comunes de baja penetrancia; sin embargo, todavía no han sido establecidas.

La mayoría de los estudios realizados hasta el momento, se han centrado en la búsqueda de variantes genéticas en regiones codificantes. De todos los estudios tan solo los SNPs rs2279744 y rs1690916 en *MDM2* y rs231775 en *CTLA4* muestran resultados que sugieren la posible asociación con la enfermedad.

Recientemente se ha demostrado la implicación de las regiones no codificantes en el origen y evolución de distintos cánceres. Los ncRNAs más estudiados son los miRNAs que ya se han descrito desregulados en OS. Además, ya se han asociado variantes genéticas que alteran la expresión de miRNAs con el origen y evolución de distintos cánceres.

Por lo tanto, nos planteamos que la susceptibilidad del OS podría ser debida, en parte, a variantes genéticas comunes como las encontradas en los genes *MDM2* y *CTLA4* y/o a variantes en genes que afecten a la función de los miRNAs.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio fue la identificación de nuevos marcadores genéticos de riesgo en OS juvenil.

Para ello, nos marcamos los siguientes objetivos específicos:

- 1. Validar los marcadores genéticos de susceptibilidad del OS propuestos en la literatura.**
 1. Comprobar la asociación de los polimorfismos rs1690916 y rs2279744 en el gen *MDM2* y el riesgo de OS mediante un estudio caso-control en dos nuevas poblaciones, revisión sistemática y MA.
 2. Comprobar la asociación del polimorfismo rs231775 en el gen *CTLA4* y el riesgo de OS, en un estudio caso control en nuestra población, revisión sistemática y MA.

- 2. Identificar los miRNAs cuya desregulación está asociada con la susceptibilidad a desarrollar OS.**
 1. Selección de miRNAs desregulados mediante la revisión sistemática de la literatura.

- 3. Determinar las variantes genéticas en genes relacionados con los miRNAs asociadas con la susceptibilidad a desarrollar OS.**
 1. Determinar la asociación de variantes genéticas en genes de procesamiento de miRNAs con la susceptibilidad del OS y su posible efecto funcional.
 2. Definir la asociación de variantes genéticas en pre-miRNAs con la susceptibilidad del OS y su posible efecto funcional.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio incluyó un total de 1076 individuos: 176 pacientes con OS y 900 controles. Las muestras de pacientes con OS se obtuvieron de 4 hospitales de referencia en España (Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona; Hospital La Paz, Madrid; y Hospital Universitario Donostia, San Sebastián) y de la Unidad de Oncología Pediátrica del Hospital “University Children’s” de Liubliana, Eslovenia. Todos los casos fueron diagnosticados por expertos patólogos y oncólogos entre los años 1985 y 2013. El grupo control estuvo compuesto por individuos donantes sanos sin parentesco entre ellos procedentes de la colección C.0001171 registrada en el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

Se obtuvo el correspondiente consentimiento informado y en los casos de los donantes menores de edad, el consentimiento fue autorizado y firmado por sus padres. Las muestras fueron codificadas y tratadas de acuerdo con la Declaración de Helsinki. El estudio fue aprobado por los comités de ética locales (105/2009 y 67/02/12). De cada individuo se recogieron los datos de edad y sexo. Las características demográficas de la población se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Distribución de la población de estudio en cuanto a edad, sexo, origen y estudio.

	Total		Controles		Casos	
Número de participantes en el estudio	1076		900		176	
Edad (media, sd)	46,63(18,48)		51,83(14,29)		18,94(12,59)	
Rango de edad cubierto	3-93		18-93		3-69	
Sexo	n	%	n	%	n	%
Masculino	540	50,18	447	49,66	93	52,84
Femenino	435	40,43	365	40,55	70	39,77
Desconocido	101	9,38	88	9,77	13	7,39
Número individuos/Centro	n	%	n	%	n	%
Universidad del País Vasco (UPV/EHU)	712	66,17	712	79,11		
Clínica Universitaria de Navarra	104	9,66			104	59,42
Hospital La Paz, Madrid	9	0,84			9	45,71
Hospital Universitario de Donostia	4	0,37			4	22,85
University Children's Hospital de Liubliana	247	22,95	188	20,88	59	33,71
Número individuos/Estudio						
Análisis asociación polimorfismos en gen <i>MDM2</i>	432		259		173	
Análisis asociación polimorfismos en gen <i>CTLA4</i>	233		125		108	
Análisis asociación genes de procesamiento miRNAs	514		411		103	
Análisis asociación miRNAs	352		256		96	

Sd= desviación estándar

2. SNPS PREVIAMENTE ASOCIADOS A LA SUSCEPTIBILIDAD DEL OS

2.1 BÚSQUEDA DE GENES ASOCIADOS A LA SUSCEPTIBILIDAD DEL OS

Para la búsqueda de los SNPs asociados al riesgo a desarrollar OS se realizó una búsqueda en la base de datos de Pubmed introduciendo los términos (polymorphisms OR “genetic variant” AND osteosarcoma OR “bone tumor”) hasta el 21 de noviembre de 2013. Para la validación se seleccionaron el rs1690916 y el rs2279744 para el gen *MDM2* y el rs231775 en el gen *CTLA4* debido a que fueron los SNPs asociados con el riesgo a desarrollar OS al menos en dos estudios.

2.2 GENOTIPADO DEL SNP rs1690916 EN EL GEN *MDM2* MEDIANTE ARMS-PCR

Se utilizó la técnica *Amplification Refractory Mutation System-Polymerase chain reaction* o amplificación por PCR de alelos (ARMS-PCR), la cual permite detectar cualquier variación genética que implique cambios de una sola base o pequeñas deleciones. Fundamentalmente, se basa en la amplificación de la región donde se sitúa el polimorfismo mediante el uso de dos parejas de cebadores, que permiten diferenciar cada uno de los alelos. La técnica se esquematiza en la figura 12.

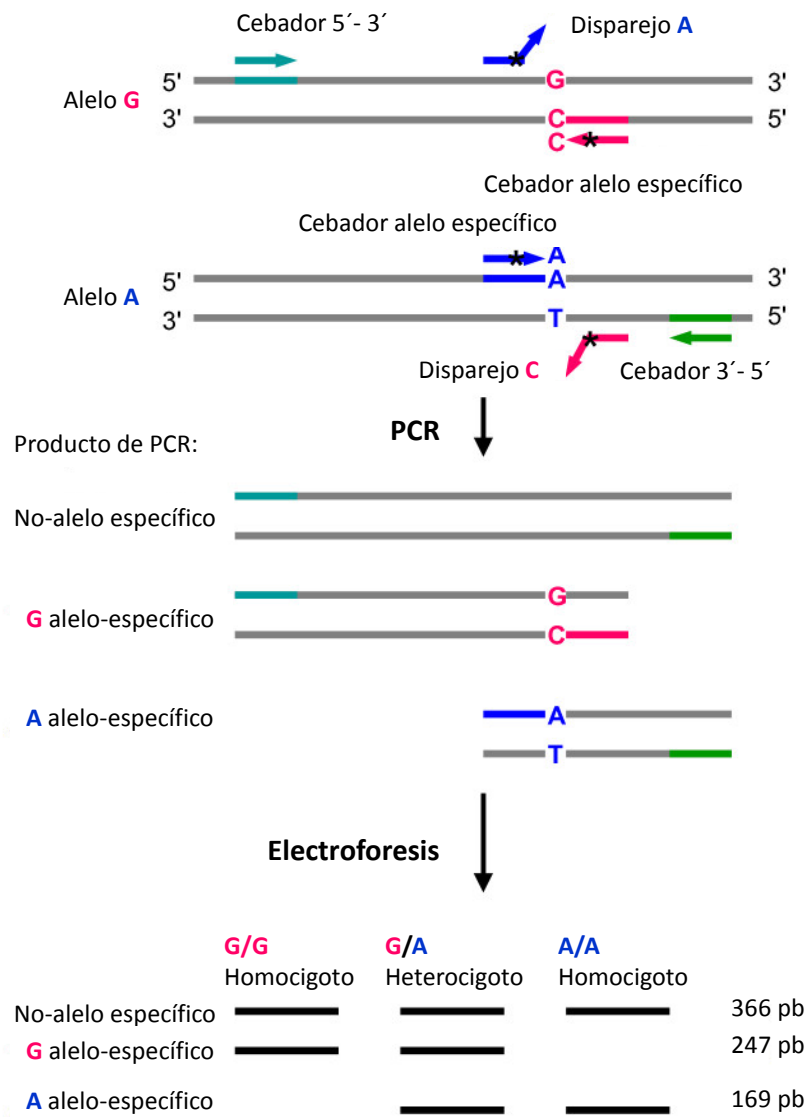


Figura 12. Esquema de ARMS-PCR para el polimorfismo rs1690916 (elaboración propia).

Los cebadores están diseñados de manera que se solapan en la ubicación del polimorfismo rs1690916, pero cada pareja solo se une perfectamente a uno de los alelos. Cada una de las parejas tiene un cebador en sentido 5'-3' (Forward o F) y otro en sentido 3'-5' (Reverse o R). Además, los dos pares de cebadores están diseñados con el objetivo de que sus productos de PCR sean de una longitud significativamente diferente. De modo que el producto del amplificado consta de una banda no-alelo específica y la banda alelo-específica correspondiente al alelo del polimorfismo. Las secuencias de los cebadores se especifican en la Tabla 6.

Tabla 6. Secuencia de los cebadores utilizados para el genotipado del SNP rs1690916 mediante ARMS-PCR.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tª de anillamiento	Tamaño (pb)
MDM2_rs16_F1	CCCCTAAGTTGAAAAACAACCTAAG	60°C	247bp
MDM2_rs16_R1	TGCTGACCCTGTCATTCTTG	60°C	
MDM2_rs16_F2	CCACCATTACCCGTAAGACA	60°C	169bp
MDM2_rs16_R2	GGCCAAGAAGGTAAGTTAAAGTGT	60°C	

En el caso de los individuos homocigotos para el alelo G se obtuvieron 2 bandas de 247 y 366 pb (calle 2, Figura 13), los individuos homocigotos para el alelo A generaron 2 bandas de 169 y 366 pb (calle 4, Figura 13) y los heterocigotos obtuvieron 3 bandas de 169, 247 y 366 pb (calle 3, Figura 13).

La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 2% en tampón TBE 1X, teñidos con SYBR Safe durante 30 minutos a voltaje constante de 90V. Por cada muestra se mezclaron 6 µl de amplificado y 4 µl de solución de carga, junto al marcador molecular Hyperladder IV (100–1000 pb). Los resultados fueron visualizados bajo luz ultravioleta con el equipo de documentación ChemiDoc XRS de BioRad.

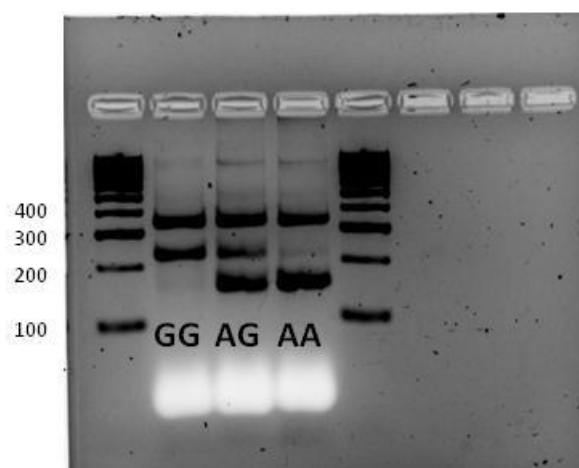


Figura 13. Gel de agarosa mostrando los resultados del genotipado de rs1690916.

2.3 GENOTIPADO DEL SNP rs2279744 EN *MDM2* MEDIANTE PCR-RFLP

La técnica *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) está basada en el uso de enzimas de restricción que reconocen dianas específicas. Tras amplificar por PCR el fragmento del ADN en el que se sitúa el polimorfismo, éste se digiere con una enzima de restricción concreta que cortará en función del alelo. De ese modo, se formarán fragmentos de diferentes longitudes, que permitirán determinar el genotipo mediante electroforesis. La técnica se esquematiza en la figura 14.

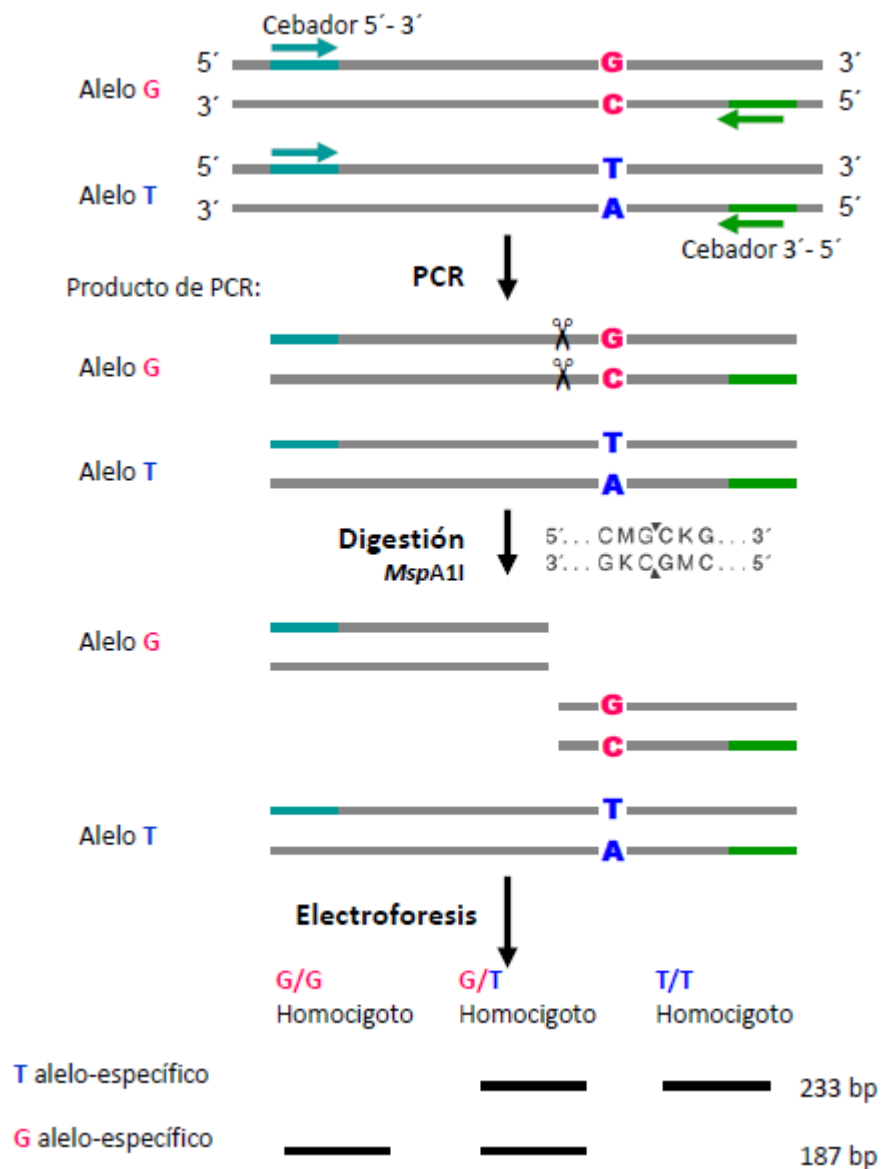


Figura 14. Esquema de la PCR-RFLP para el polimorfismo rs2279744. La banda que determina el alelo T en la figura es de 233 pb. La banda que determina el alelo G en la figura es de 187 pb. En la figura no se han mostrado las bandas inferiores a 100 pb.

Tras comprobar la correcta amplificación de la PCR en geles de agarosa al 2% (264pb), digerimos los fragmentos amplificados con la enzima de restricción MspA1I a 37°C durante toda la noche. Esta enzima reconoce de forma específica la secuencia 5'-C(A/C)G'C(G/T)G-3' donde se sitúa el polimorfismo rs2279744 en quinta posición (Tabla 7). Los individuos homocigotos para el alelo G dieron lugar a tres fragmentos de 31 pb, 46 pb y 187 pb; las muestras heterocigotas generaron 4 fragmentos: 31 pb, 46 pb, 187 pb y 233 pb y los homocigotos para el alelo T generaron 2 fragmentos de 31 pb y 233 pb.

Tabla 7. Secuencia de los cebadores utilizados para el genotipado del SNP rs2279744 mediante RFLP.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tª de anillamiento	Tamaño (pb)
MDM2_rs22_F	CGGGAGTTCAGGGTAAAGG	60°C	264 pb
MDM2_rs22_R	CTGGGAAAATGCATGGTTTAA	60°C	

El enzima de restricción se eligió utilizando el software NEBcutter v2.0 de New England Biolabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Las electroforesis de ambos procesos (de la PCR y de la digestión de los fragmentos) se realizaron en geles de agarosa al 2%. La representación de las bandas en un gel se muestra en la figura 15.

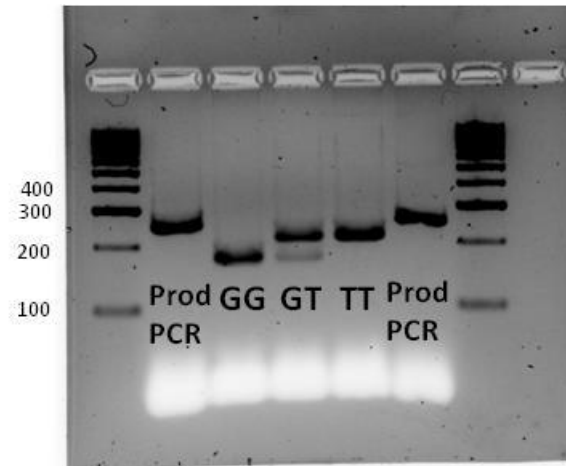


Figura 15. Gel de agarosa mostrando los resultados del genotipado de rs2279744.

2.4 META-ANÁLISIS DE LOS SNPS rs1690916 y rs2279744 DEL GEN *MDM2*

Estrategia de búsqueda

Se realizó una búsqueda informatizada para identificar las publicaciones que estudiaban la asociación entre los polimorfismos rs1690916 y rs2279744 (también conocido como T309G) del gen *MDM2* y el riesgo de padecer OS. Para ello, se utilizaron las bases de datos Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) y Scopus (www.scopus.com). Con el fin de identificar todos los estudios realizados hasta el momento, se fijaron los siguientes criterios de búsqueda:

1. ("*bone tumor*" or osteosarcoma) and (*polymorphism* or SNP)
2. rs1690916 or rs2279744 or T309G
3. (*MDM2* or "*murine double minute 2*") and ("*bone tumor*" or osteosarcoma)

En la búsqueda se incluyeron todos los registros publicados hasta el 24 de febrero del 2014.

Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión que se tuvieron en cuenta fueron los siguientes:

- a) Estudios de asociación independientes.

b) Estudios que analizaran los polimorfismos rs1690916 y/o rs2279744 y susceptibilidad a OS.

A continuación se eliminaron todos los artículos duplicados y se hizo una primera fase de selección. Los criterios de exclusión se aplicaron en el siguiente orden:

- a) Otro tipo de publicación: En esta categoría se clasificaron todas aquellas publicaciones que no fueran artículos: Revisiones, cartas al editor, MA, etc.
- b) Otra enfermedad: Artículos que estudiaban otras enfermedades.
- c) Estudio no en humanos: Estudios realizados en otro tipo de organismos.
- d) No publicado en inglés
- e) Otra región genómica: En esta categoría fueron incluidos los estudios que analizaban otros genes, genomas (ADN mitocondrial) u otras regiones cromosómicas.
- f) No estudio de polimorfismos: Estudios de expresión, metilación, diferenciación, caracterización bioquímica o morfológica, ligamiento o estudios funcionales, de clonación, interacción génica, etc.
- g) Otra variante: Los artículos que estudiaban otros polimorfismos, otras mutaciones, CNV, LOH, microsatélites o alteraciones del ADN fueron incluidos en esta categoría.
- h) No estudia susceptibilidad: Los estudios de farmacogenética, respuesta a fármacos, pronóstico, supervivencia, toxicidad, etc. conforman esta categoría.
- i) Anterior a 1990.

La primera fase de selección se basó únicamente en el resumen de las publicaciones. Aquellos artículos sin resumen disponible pasaron directamente a una segunda fase de selección. Esta fase posterior se basó en una lectura del texto completo del artículo. En esta ocasión se utilizaron los mismos criterios de exclusión, añadiendo dos más: (1) Menos de 10 muestras y (2) Artículos sin texto completo. De esta forma se obtuvo el número final de artículos que se incluyeron en el estudio. En estos artículos se revisaron además las referencias citadas, para identificar artículos adicionales no indexados en las bases de datos habituales.

La búsqueda y selección de artículos fue realizada por dos investigadores de modo independiente y los desacuerdos se solventaron por consenso. Todo el proceso seguido en la revisión sistemática ha sido representado gráficamente en un *flow chart* (sección de resultados), en el que se especifica el total de artículos incluidos y el número de publicaciones excluidas por cada criterio.

Extracción de datos

De cada artículo seleccionado se recopiló el año de la publicación, los nombres de los autores, la etnia de la población utilizada, el número de pacientes y controles y las frecuencias genotípicas de los polimorfismos rs1690916 y rs2279744 del gen *MDM2*. En aquellos casos en los que la información genotípica no estaba disponible, se solicitó la información directamente a los autores.

Con el fin de determinar si los polimorfismos rs1690916 y rs2279744 del gen *MDM2* influían en el riesgo de OS, se llevó a cabo un meta-análisis, incluyendo los datos brutos de los artículos obtenidos en la revisión sistemática, y los datos brutos de las dos poblaciones estudiadas en este trabajo (ver apartados 2.2 y 2.3).

Análisis de la calidad de los estudios

La calidad de los estudios incluidos fue evaluada por dos investigadores independientes. Cada estudio se puntuó de acuerdo a una “escala para la evaluación de la calidad metodológica” (Tabla 8), que fue modificada de anteriores MA (132, 133). En la escala se incluyeron 5 secciones: representatividad de los casos, procedencia de la muestra control, tamaño de muestra, control de calidad del método de genotipado y EHW; que fueron cuidadosamente revisadas. La puntuación osciló entre 0 y 10. Puntuaciones superiores a 5 se consideraron aceptables.

Tabla 8. Escala para la evaluación de la calidad metodológica de los estudios.

Criterio	Puntuación
1. Representatividad de casos	
OS diagnosticado de acuerdo a criterios reconocidos	2
Criterio de diagnóstico mencionado pero no específicamente descrito	1
No descrito	0
2. Procedencia de la muestra control	
Poblacional	3
Controles de hospital sin OS	2
Voluntarios sanos sin descripción completa	1
Controles sin OS con enfermedades relacionadas	0,5
No descrito	0
3. Tamaño de muestra	
>100	2
25-100	1
<25	0
4. Control de calidad del método de genotipado	
Repetición de parte/todas las muestras con un método diferente	2
Repetición de parte/todas las muestras con el mismo método	1
No descrito	0
5. Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW)	
Equilibrio de Hardy-Weinberg en población control	1
Desequilibrio de Hardy-Weinberg en población control	0

Meta-análisis

Se evaluó la asociación de los polimorfismos rs1690916 y rs2279744 con el riesgo a desarrollar OS mediante el modelo alélico, codominante, dominante y recesivo. Se combinaron los datos de los genotipos de cada estudio para analizar la asociación con la susceptibilidad, obteniendo el estimador global del riesgo mediante OR y 95%IC calculado mediante el método de Mantel-Haenszel con el modelo de efectos aleatorios (134). El modelo de efectos aleatorios asume que la variación entre estudios se debe al azar y al efecto individual de cada estudio. Los datos se procesaron utilizando la librería meta del software R (Versión de R 3.0.3, the R Foundation for Statistical Computing). El resultado del MA se representó gráficamente en un *forest plot*. Esta figura representa en un solo eje los valores del OR y 95%IC de cada estudio, el tamaño de muestra y el estimador global del MA.

Análisis de heterogeneidad

La heterogeneidad en el MA fue evaluada con el estadístico I^2 , que cuantifica la variabilidad entre los estudios, proporcionando un valor del grado de inconsistencia de los resultados obtenidos. Este estadístico es independiente del número de estudios incluidos en el MA. Tiene un valor entre 0 y 100 % y describe el porcentaje de variación total entre los estudios que es debida a la heterogeneidad que hay entre ellos más que al azar. Un valor de I^2

alto denota un grado elevado de heterogeneidad. Habitualmente se considera que el valor I^2 de 0-25 %, no hay heterogeneidad, 25-50 % heterogeneidad moderada, 50-75 % gran heterogeneidad y 75-100 % heterogeneidad alta. En los casos de heterogeneidad alta en el MA, se realizó un análisis de influencias para saber qué estudio era el causante de dicha heterogeneidad. El análisis de influencias consiste en una estimación del propio MA, omitiendo un estudio cada vez que se vuelve a recalcular el MA.

Análisis del sesgo de publicación

El sesgo de publicación, es decir, la publicación selectiva de estudios en base a sus hallazgos, representa un riesgo para la validez de cualquier MA. Independientemente de la calidad de los estudios, es menos probable que se publiquen estudios con resultados no concluyentes o negativos (135, 136), por lo que su exclusión puede sesgar los resultados de la revisión sistemática. Es el llamado sesgo de publicación, que da lugar a que es más probable que en la revisión sistemática que excluye estudios no publicados sobrestimen la relación entre la exposición y el evento de interés (137).

El análisis del sesgo de publicación de la literatura empleada en el meta-análisis se analizó mediante el test de Egger (138) y se representó en el “*funnel plot*” de Begg que contrastan la hipótesis nula de ausencia de sesgo de publicación.

2.5 GENOTIPADO DEL SNP rs231775 EN CTLA4

El SNP rs231775 situado en el gen *CTLA4*, se genotipó mediante PCR-RFLP con la enzima de restricción *BstEII*. Las secuencias de cebadores se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Secuencia de los cebadores utilizados para el genotipado del SNP rs231775 mediante RFLP.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tª de anillamiento	Tamaño (pb)
CTLA4_rs23_F	AAGGCTCAGCTGAACCTGGC	60°C	153 pb
CTLA4_rs23_R	CTGCTGAAACAAATGAAACCC	60°C	

2.6 META-ANÁLISIS DEL SNP rs231775 DEL GEN *CTLA4*

Con el fin de determinar si el polimorfismo rs231775 del gen *CTLA4* estaba asociado con el riesgo de OS, se llevó a cabo una búsqueda sistemática y un MA, siguiendo la misma estrategia metodológica que la realizada para *MDM2* (apartado 2.4), salvo con algunas excepciones.

En este caso, los criterios de búsqueda fueron los siguientes:

1. ("bone tumor" or osteosarcoma) and (polymorphism or SNP)
2. rs231775 OR +49G>A
3. (CTLA4 or "cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4") and ("bone tumor" or osteosarcoma)

En la búsqueda se incluyeron todos los registros publicados hasta el 25 de marzo del 2014.

Todos los artículos obtenidos en la revisión sistemática, además de los resultados obtenidos en población española, fueron incluidos en el MA.

La asociación entre el polimorfismo rs231775 y OS se evaluó mediante la comparación de los genotipos AA vs GG+GA y el modelo alélico (A vs G).

3. SNPS EN GENES RELACIONADOS CON LOS MIRNAS

El segundo objetivo de esta tesis fue determinar los miRNAs desregulados en relación a la susceptibilidad a desarrollar OS.

3.1 BÚSQUEDA DE MIRNAS DESREGULADOS EN LA SUSCEPTIBILIDAD DEL OSTEOSARCOMA

Estrategia de búsqueda

Se realizó una búsqueda informatizada para identificar las publicaciones que estudiaban la asociación entre la desregulación de los miRNAs y la susceptibilidad del OS. Para ello, se utilizó la base de datos Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed). Con el fin de identificar todos los estudios realizados hasta el momento, se fijó el algoritmo de búsqueda ((“mir” OR “miRNA”) AND osteosarcoma). En la búsqueda se incluyeron todos los registros publicados hasta el 12 de septiembre del 2014.

Criterios de inclusión y exclusión

Esta búsqueda tenía como objetivo localizar artículos en los que se estudiara las diferencias de expresión de miRNAs en tejido óseo no afectado de individuos con OS pediátrico frente a tejido óseo de individuos sanos.

Los criterios de exclusión se aplicaron en el siguiente orden:

- a) Artículo sobre base de datos.
- b) Otra enfermedad: Artículos que estudiaban otras enfermedades.
- c) Estudio no en humanos: Estudios realizados en otro tipo de organismos.
- d) Artículos centrados en la búsqueda de dianas de miRNAs.
- e) Otro tipo de publicación: En esta categoría se clasificaron todas aquellas publicaciones que no fueran artículos: Revisiones, cartas al editor, MA, etc.

f) Otra región genómica: En esta categoría fueron incluidos los estudios que analizaban otros genes o RNAs no codificantes.

g) Estudio de comportamiento de los miRNAs tras administrar el fármaco.

h) No estudia susceptibilidad: Los estudios de farmacogenética, respuesta a fármacos, pronóstico, supervivencia, toxicidad, etc. conforman esta categoría.

Aquellos artículos sin resumen disponible pasaron directamente a una segunda fase de selección. Esta fase posterior se basó en una lectura del texto completo del artículo. En esta ocasión se utilizaron los mismos criterios de exclusión, añadiendo dos más: (1) OS no pediátrico o juvenil (> 34 años) y (2) Artículos sin texto completo. En estos artículos se revisaron además las referencias citadas, para identificar artículos adicionales no indexados en las bases de datos habituales.

La búsqueda y selección de artículos fue realizada por dos investigadores de modo independiente y los desacuerdos se solventaron por consenso. Todo el proceso seguido en la revisión sistemática ha sido representado gráficamente en un *flow chart* (sección de resultados), en el que se especifica el total de artículos incluidos y el número de publicaciones excluidas por cada criterio.

No se encontró ningún trabajo que analizara diferencias de expresión de miRNAs comparando tejido óseo sano de paciente con OS y tejido óseo de individuo sano.

3.2. ESTUDIO DE SNPS EN GENES DE PROCESAMIENTO DE MIRNAS

3.2.1 SELECCIÓN DE GENES DE PROCESAMIENTO DE MIRNAS Y SNPS

Tras revisión bibliográfica utilizando los términos “microRNA-machinery genes” OR “microRNA Biosynthesis Pathways” en Pubmed (hasta marzo 2011) y la base de datos Patrocles, se seleccionaron los genes implicados en el procesamiento de los miRNAs; un total de 21 genes (72, 139) (Tabla 10).

Tabla 10. Genes implicados en la biogénesis y procesamiento de miRNAs.**GENES DEL PROCESAMIENTO DE MIRNAS**

COMPLEJO RISC	COMPLEJO GENIM	<i>GENIM3</i>	
		<i>GENIM4</i>	
		<i>GENIM5</i>	
		AGO	<i>EIF2C1</i>
			<i>EIF2C2</i>
		<i>HIWI</i>	
	COMPLEJO CCR-NOT	<i>CNOT1</i>	
		<i>CNOT2</i>	
		<i>CNOT3</i>	
		<i>CNOT4</i>	
		<i>CNOT5</i>	
		<i>CNOT6</i>	
	GW182	<i>TNRC6A</i>	
		<i>TNRC6B</i>	
<i>SND1</i>			
DROSHA/DGR8	DGCR8	<i>DGCR8</i>	
	DROSHA	<i>DROSHA</i>	
COMPLEJO DICER	XPO5	<i>XPO5</i>	
	RAN	<i>RAN</i>	
	DICER	<i>DICER</i>	
	TRBP	<i>TRBP</i>	

En estos 21 genes, se seleccionaron un total de 72 SNPs siguiendo los siguientes criterios (a) tagSNPs con $r^2 > 0,8$, con el objetivo de captar toda la variabilidad genética de los genes seleccionados. Para ello se utilizó la base de datos del proyecto Internacional HapMap (versión #24; <http://www.hapmap.org>) y el software Haploview v4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) (Broad Institute, Cambridge, USA), SNPs con posible efecto funcional, considerando aquellos que provocaban cambios de aa, *splicing* alternativo, aquellos localizados en la región promotora en lugares de unión de factores de

transcripción, o que creaban/eliminaban dianas de miRNAs. Para ello se emplearon las bases de datos, F-SNP (<http://compbio.cs.queensu.ca/F-SNP/>) (Queen's University, Kingston, Canada), Fast-SNP (<http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw>) (Academia Sinica, Taipei, Taiwan) y Patrocles. Adicionalmente, se seleccionaron SNPs que habían sido previamente asociados con el riesgo de cáncer en la literatura.

Se seleccionaron los SNPs que tenían una frecuencia del alelo menor (MAF) mayor del 5% (MAF \geq 0,05) en poblaciones europeas y caucásicas (tabla 11 y tabla anexa 10).

Tabla 11. Selección de polimorfismos en genes de procesamiento de miRNAs.

Gen	SNP
CNOT1	rs11644694, rs11866002, rs37060
CNOT2	rs10506586
CNOT3	rs42318
CNOT4	rs1003226, rs3763425, rs3812265
CNOT6	rs11738060, rs6877400
DGCR8	rs1640299, rs35987994, rs3757 rs417309, rs9606248
DICER1	rs1057035, rs1209904, rs13078, rs3742330
DROSHA	rs10035440, rs10719, rs17408716, rs2287584, rs3792830, rs3805500, rs4867329, rs493760, rs55656741, rs639174, rs6877842, rs6884823, rs7735863
EIF2C1	rs595961, rs636832
EIF2C2	rs2292778, rs2293939, rs4961280
GEMIN3	rs197388, rs197412, rs197414, rs563002
GEMIN4	rs1062923, rs2740348, rs34610323, rs3744741, rs7813, rs910924
GEMIN5	rs1974777, rs6865950, rs816736
PIWIL1	rs1106042
RAN	rs11061209, rs14035
SMAD5	rs3764941, rs3764942
SND1	rs17151639, rs17676986, rs322825, rs3823994
TNRC6A	rs6497759
TNRC6B	rs139919, rs2413621, rs470113, rs4821943, rs9611280
TARBP2P	rs784567
XPO5	rs1106841, rs2227301, rs2257082, rs34324334, rs7755135

3.2.2 GENOTIPADO DE SNPs EN GENES DE PROCESAMIENTO DE MIRNAS

El genotipado de SNPs en genes de procesamiento de miRNAs se llevó a cabo en los Servicios Generales de Investigación (SGIKER) de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) mediante la tecnología Taqman Open Array (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La plataforma de genotipado Taqman Open Array contiene ensayos Taqman de genotipado de SNPs en un formato de array de 3072 nanoporos. En cada nanoporo se colocan las sondas de un único SNP (cada reacción es independiente).

Las sondas TaqMan permiten medir la producción de productos de PCR mediante un sistema de sondas marcadas mediante dos fluorocromos: un fluoróforo en su extremo 5' (denominado en inglés «*reporter*») y una molécula en el 3' que bloquea la emisión de fluorescencia (denominada en inglés «*quencher*»). Esta sonda marcada hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR (con la sonda más el par de cebadores específicos), la sonda hibrida con el amplicón, pero debido a la cercanía del fluoróforo al *quencher*, no se emite fluorescencia. Cuando la polimerasa se topa con la sonda, la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del *quencher* del fluoróforo y, por tanto, la emisión de fluorescencia. La fluorescencia estará, por tanto, relacionada con la cantidad de amplicón producido (Figura 16).

La fluorescencia se detectó utilizando “Real Time ABI PRISM 7900 sequence detector”. Para cada SNP, cada genotipo tuvo una fluorescencia específica: verde en el caso de homocigosidad del alelo 1 (fluoróforo VIC en extremo 5'), azul en el caso de homocigosidad del alelo 2 (fluoróforo FAM en extremo 5') y amarillo en el caso de heterocigosidad (Figura 16).

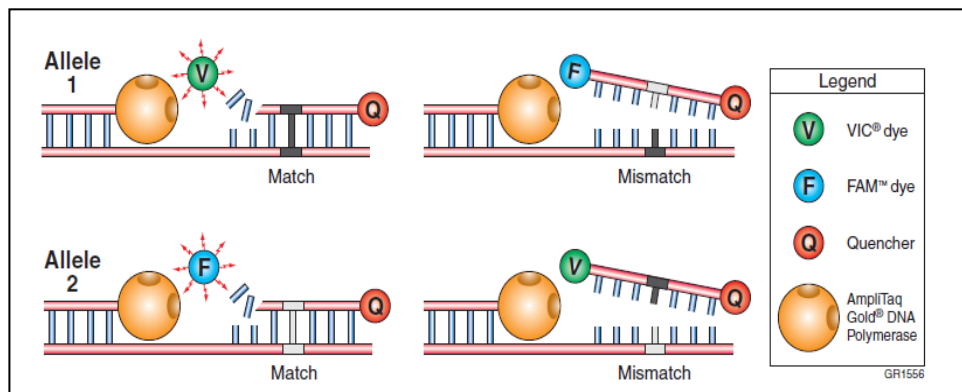


Figura 16. Representación del genotipado de polimorfismos mediante sondas TaqMan (140).

Los resultados se analizaron mediante el software “Taqman Genotyper” que permite el análisis de *clusters* y *calling* (Figura 17). El *clustering* es el proceso de agrupación de muestras en base a la señal de fluorescencia. El *calling* es el proceso de asignación de genotipo a cada muestra.

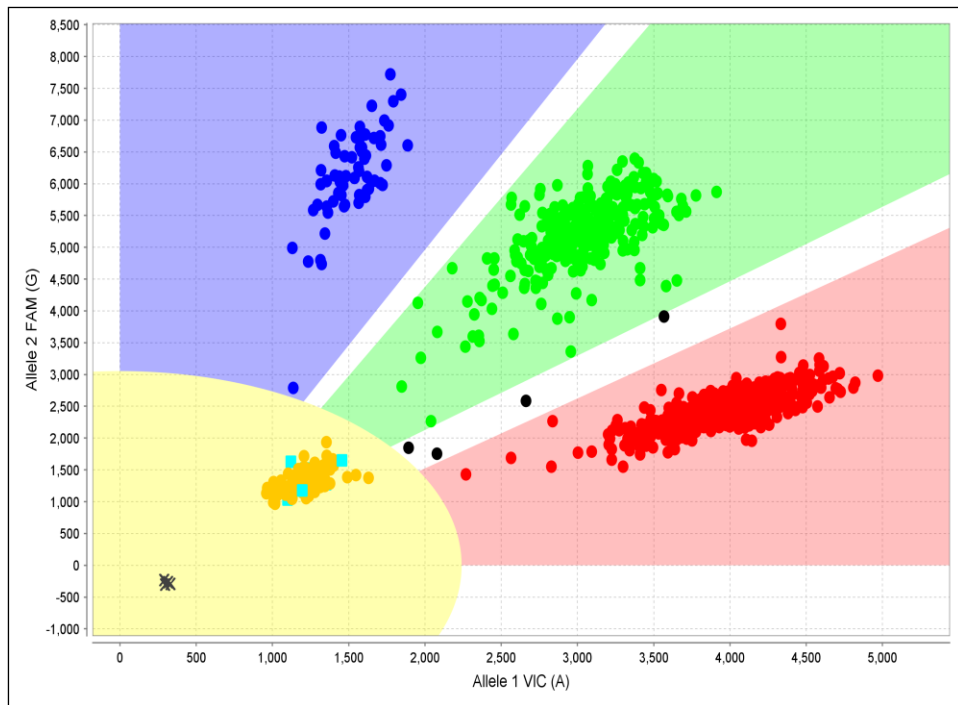


Figura 17. Representación del análisis de “cluster” y “calling” con el software TaqmanGnotyper. Los individuos AA están marcados en rojo, AG en verde, GG en azul, los individuos cuyo genotipado fallido en amarillo y los blancos se representan mediante cuadros azul claro.

Como control de genotipado, se analizaron 10 muestras por duplicado. Los SNPs que mostraron errores de transmisión alélica mendeliana o que mostraron genotipos discordantes se excluyeron del análisis.

3.3 SNPS EN MIRNAS

3.3.1 SELECCIÓN DE GENES DE MIRNAS Y MIR-SNPS

Debido a que no se han estudiados los miRNAs desregulados en la susceptibilidad a desarrollar OS infantil y teniendo en cuenta que:

1. Los SNPs localizados en la región *seed* del pre-miRNA pueden desestabilizar la interacción miRNA-mRNA o incluso cambiar las dianas del miRNA.
2. Los SNPs localizados en los pre-miRNAs pueden influir en su procesamiento y/o selección de dianas (interacciones miRNA-mRNA) (141).

3. Los miRNAs pueden regular un gran número de genes que no están completamente definidos, por lo que cualquier miRNA podría estar implicado en la regulación de los genes que afectan al riesgo de OS pediátrico.

4. El número de polimorfismos en mir-SNPs con una frecuencia del alelo menor (MAF) mayor del 1% descritos en la población caucásica fue abordable metodológicamente en el momento de la selección.

Se decidió incluir en el estudio todos los SNPs descritos en pre-miRNAs.

Para la búsqueda de los mir-SNPs se introdujeron todos los miRNAs descritos hasta el momento (www.mirbase.org) en la base de datos miRNA SNIPER (<http://www.integratomics-time.com/miRNAs-SNIPER/>). Posteriormente, se introdujeron todos los SNPs en la base de datos dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) para la búsqueda de la MAF. Se seleccionaron todos aquellos SNPs con un MAF mayor del 1% ($MAF \geq 0,01$) en la población caucásica.

3.3.2 GENOTIPADO DE POLIMORFISMOS EN GENES DE PRE-MIRNAS

El genotipado de SNPs en miRNAs se realizó utilizando la tecnología GoldenGate de VeraCode, Illumina, en el Centro Nacional de Genotipado (CeGen-ISCI). Esta plataforma permite un ensayo multiplex de PCR, lo que significa que es posible procesar un gran número de SNPs de manera simultánea (más de 1536 SNPs) por lo que se minimiza el tiempo, volumen de reactivos y requisitos materiales en el proceso.

El ensayo GoldenGate consiste en varios pasos. En primer lugar, la muestra de ADN se marca con Biotina o Estreptavidina (250ng de ADN a 50 ng/ μ L). Esta marca sirve para que, posteriormente, se le unan los *primers* específicos diseñados para cada SNP. En concreto, se diseñan 3 *primers*: dos de ellos son específicos para cada alelo del SNP (denominados ASOs); el tercer *primer* hibrida unas bases aguasabajo del locus del SNP (denominado LSO). El LSO contiene un código que identifica cada SNP. El siguiente paso es la extensión de los ASOs hacia la LSO y posteriormente se amplifican esta región mediante PCR con *primers* universales. Estos *primers* están marcados con diferentes colorantes para cada ASO (Cy-3 y Cy-5). De esta manera se puede identificar cada alelo del SNP. Estos productos se hibridan en una matriz permitiendo el análisis de cada SNP mediante señal fluorescente (Figura 18).

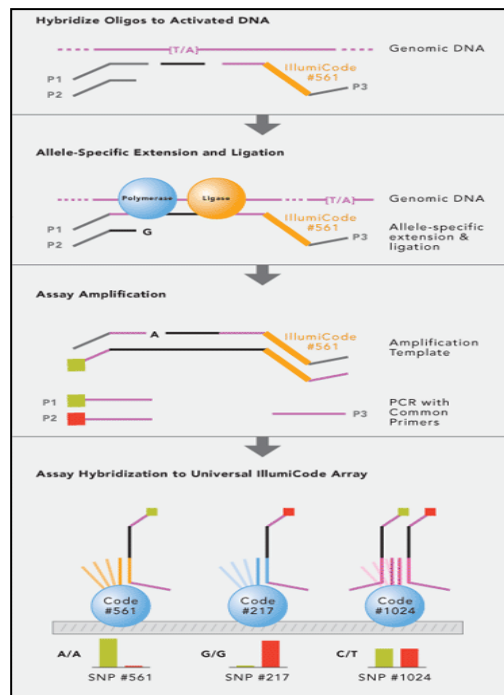


Figura 18. Resumen del ensayo GoldenGate.

3.3.3 ANÁLISIS *IN SILICO* DE LA PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LOS MIRNAS

Con el objetivo de establecer los cambios provocados por los SNPs en la estructura del pre-miRNA se realizó un análisis *in silico* con la herramienta bioinformática miRNASNP (versión 2) (<http://www.bioguo.org/miRNASNP/>).

4. ANÁLISIS DE ESTADÍSTICOS DE LOS ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN

El éxito de genotipado para cada SNP se calculó con el software Haploview (v 4.2).

Antes de realizar un análisis de asociación se debe comprobar si se cumple el principio de EHW en la muestra de controles para saber si este grupo es representativo de la población general desde el punto de vista genético. El principio del EHW determina qué frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo en el caso de que no ocurran fenómenos distorsionadores que dieran lugar a la desviación de los genotipos. Esta desviación puede deberse a errores en el método de genotipado, cosanguinidad entre individuos o a la

existencia de fenómenos de selección de alelos. El EHW en la población control se evaluó mediante el test de χ^2 o test exacto de Fisher. Se tomó un nivel de significancia de 0,05. Solo se incluyeron aquellos SNPs que estaban en equilibrio en la población control.

El análisis de asociación se calculó mediante la OR y el correspondiente 95%IC de cada genotipo respecto de la referencia para cuantificar la magnitud de la asociación. La comparación de frecuencias genotípicas entre casos y controles se llevó a cabo mediante el modelo de regresión logística utilizando 5 modelos de herencia genéticos diferentes (alélico, codominante, dominante, recesivo y aditivo). El modelo alélico postula que uno de los alelos provoca el riesgo, el modelo codominante postula que cada genotipo proporciona un riesgo de la enfermedad diferente y no aditivo; el modelo dominante supone que una única copia del alelo de riesgo es suficiente para modificar el riesgo; el modelo recesivo supone que son 2 copias del alelo para modificar el riesgo y el modelo aditivo supone que cada copia del alelo modifica el riesgo en una cantidad aditiva (142). La comparación de frecuencias alélicas entre casos y controles se llevó a cabo mediante el test de χ^2 . Se tomó un nivel de significancia de 0,05. Debido al gran número de SNPs en estudio y por tanto, al gran número de comparaciones, es frecuente que haya falsos positivos. En consecuencia, los valores de significancia se corrigieron mediante dos métodos (1) False Discovery Rate (FDR): se calcula teniendo en cuenta el número de SNPs significativos obtenidos (2) Bonferroni: se calcula teniendo en cuenta todos los SNPs estudiados y por ello, es un método más conservador (143). Los datos se procesaron utilizando la librería SNPAssoc para el software R (Versión de R 3.0.3, “the R Foundation for Statistical Computing”).

Anexo

1. PROTOCOLOS DE PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de ADN se extrajeron a partir de distintos tejidos: 2-4 ml de sangre periférica (SP) en el caso de pacientes con OS españoles y controles; 2-4 ml de saliva en el caso de los controles españoles; y tejido parafinado no afectado en el caso de pacientes eslovenos.

1.1 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA

Se siguió el método de Fenol-Cloroformo estándar (144).

1. Añadir 250µl de SP en un tubo de 1,5ml.
2. Añadir 500µl de buffer de Lisis (Tris 10mM, EDTA 10mM, NaCl 0,1M, SDS 2%, DTT 40mM y Proteinasa K 0,2mg/ml) e incubar en baño termostático con agitación a 37°C toda la noche ó a 56°C durante 2-3 horas.
3. Añadir 200µl de fenol-cloroformo-isoamiloalcohol en proporción 25:24:1. Homogeneizar invirtiendo suavemente los tubos.
4. Centrifugar durante 10 minutos a 13000 rpm. Con ayuda de una pipeta, recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo.
5. Precipitar el ADN añadiendo acetato sódico 2M en proporción 1/10, 1 µl de glucógeno (20 mg/ml) y 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Homogeneizar invirtiendo suavemente los tubos.
6. Centrifugar durante 20 minutos a 13000 rpm. Eliminar el sobrenadante.
7. Lavar el pellet de ADN con 1 ml de etanol al 80% frío.
8. Centrifugar de nuevo durante 5 minutos a 13000 rpm.
9. Secar el pellet de ADN al aire y resuspender en 40 µl de H₂O bd estéril.
10. Almacenar a – 20°C.

El ADN se conservó a una concentración de 50ng/ml para el genotipado.

1.2 EXTRACCIÓN DE ADN DE TEJIDO FIJADO EN FORMOL E INCLUIDO EN PARAFINA

El ADN de muestras parafinadas se extrajo con el Mini kit QIAamp DNA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen, Hilden, Alemania).

La extracción de ADN comienza con una fase de desparafinización con xileno. La parafina se derrite en la incubación a 56°C.

1. Poner una pequeña porción (no más de 25mg) de tejido embebido en parafina en 2ml de tubo de microcentrifuga.
2. Añadir 1200 µl de Xileno. Vortexear vigorosamente.
3. Centrifugar a velocidad máxima durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Eliminar sobrenadante sin eliminar pellet.
5. Añadir 1200 µl de etanol (96–100%) al pellet y eliminar el xilol residual mezclando con vortex.
6. Centrifugar a velocidad máxima 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Eliminar el etanol evitando tocar el pellet.
8. Repetir lavado de etanol (96-100%) para eliminar el Xilol restante.
9. Incubar el tubo a 37°C durante 10–15 minutos hasta que el etanol se evapore.
10. Resuspender el pellet con 180 µl de Buffer ATL.

Posteriormente, se siguió el protocolo de purificación de ADN

11. Añadir 20 µl de Proteinasa K e incubar durante toda la noche a 56°C en baño húmedo con agitación.
12. Añadir 200 µl Buffer AL a la muestra, e incubar a 70°C durante 10 min.
13. Añadir 200 µl de etanol (96–100%) a la muestra.
14. Incluir el precipitado en la columna QIAamp Mini spin (2 ml) y centrifugar a (8000 rpm) durante 1 minuto.
15. Añadir 500 µl Buffer AW1 y centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto. Cambiar la columna QIAamp Mini spin a un tubo nuevo de 2 ml.
16. Añadir 500 µl Buffer AW2 y centrifugar a 14.000 rpm durante 3 min. Cambiar la columna a un nuevo tubo de 1,5ml.
17. Añadir 200 µl de agua destilada a la columna. Incubar a temperatura ambiente durante un 1 minuto, y centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto.

1.3 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SALIVA

El ADN de las muestras de individuos sanos españoles se extrajo con el kit Orangene DNA de DNA Genotek.

1. En 250 μ l de saliva añadir 470 μ l de buffer de lisis (Tris 10mM, EDTA 10mM, NaCl 0,1M, SDS 2%, DTT 40mM y Proteinasa K 0,2mg/ml).
2. Añadir 20 μ l de DTT (1M).
3. Añadir 10 μ l de Proteinasa K (10mg/ml).
4. Incubar 1-3 h a 56 $^{\circ}$ C (ó 58 $^{\circ}$ C).
5. Añadir 1/25 volumen de la solución Purifier [(500 μ l de "saliva + buffer" 20 μ l de Purifier)].
6. Incubar en hielo 10 minutos.
7. Centrifugar a 13000rpm durante 15 min a temperatura ambiente.
8. Recoger el sobrenadante y transferir a un tubo nuevo. Desechar el tubo con pellet.
9. Opcional: Añadir 5 μ l de Glucógeno (20mg/ml).
10. Añadir 1 volumen de etanol al 96-100% a 750 μ l de sobrenadante Voltrear suavemente 10 veces.
11. Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos para que el ADN precipite.
12. Centrifugar 2 min a 13000 rpm.
13. Quitar sobrenadante.
14. Opcional: Lavado de etanol. Añadir 250 μ l de 70% de etanol. Incubar 1 min a temperatura ambiente.
15. Centrifugar 13000 rpm durante 5 min.
16. Eliminar el sobrenadante (etanol) y dejar secando
17. Resuspender el pellet en 50 μ l H₂O bidestilada estéril.

1.4 VALORACIÓN DE LA CANTIDAD Y CALIDAD DEL ADN GENÓMICO

La concentración del ADN extraído se estimó espectrofotométricamente en el Nanodrop ND1000. La relación obtenida entre las lecturas a 260 nm y 280 nm (OD₂₆₀/OD₂₈₀) proporcionó una estimación de la pureza del ADN (valores comprendidos entre 1,8 y 2 indican que la pureza del ADN es alta).

2. PROTOCOLOS DE GENOTIPADO

2.1 GENOTIPADO DE rs1690916 EN EL GEN *MDM2*

Tabla anexa 1. Protocolo de PCR para el genotipado del SNP rs1690916 mediante ARMS-PCR.

<i>Reactivos del MIX [stock]</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Volumen muestra (μl)</i>
Agua estéril	-	16,15
dNTPs (10 mM)	0,2mM	0,5
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM	0,75
Buffer (10X)	1x	2,5
Cebador F1 rs16 10 μ M	10pmol	1
Cebador F2 rs16 10 μ M	10pmol	1
Cebador R1 rs16 10 μ M	10pmol	1
Cebador R2 rs16 10 μ M	10pmol	1
Enzima Immolasa (5 U/ μ l)	0,5 U	0,1
Totales	-	24
ADN (50 ng/ul)	100 ng	1
Volumen final	-	25

Tabla anexa 2. Condiciones de PCR para el genotipado del SNP rs1690916 mediante ARMS-PCR.

	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Nº Ciclos</i>
Desnaturalización inicial	95°C	10 min	
Desnaturalización	95°C	30seg	
Anillamiento	60°C	30 seg	35 ciclos
Extensión	72°C	30 seg	
Extensión final	72°C	10 min	

2.2 GENOTIPADO DE rs2279744 EN EL GEN *MDM2*

Tabla anexa 3. Protocolo de PCR para el genotipado del SNP rs2279744 mediante RFLP.

<i>Reactivos del MIX [stock]</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Volumen muestra (μl)</i>
Agua estéril	-	18,15
dNTPs (10 mM)	0,2mM	0,5
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM	0,75
Buffer (10X)	1x	2,5
Cebador F rs22 10 μ M	10pmol	1
Cebador R rs22 10 μ M	10pmol	1
Enzima Immolasa (5 U/ μ l)	0,5 U	0,1
Totales	-	23
ADN (50 ng/μl)	100 ng	1
Volumen final	-	25

Tabla anexa 4. Condiciones de PCR para el genotipado del SNP rs2279744 mediante RFLP.

	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Nº Ciclos</i>
Desnaturalización inicial	95°C	10 min	
Desnaturalización	95°C	30seg	
Anillamiento	60°C	30 seg	35 ciclos
Extensión	72°C	30 seg	
Extensión final	72°C	10 min	

Tabla anexa 5. Protocolo de digestión con enzima MspA1I para el genotipado del SNP rs2279744 mediante RFLP.

Reactivos	Concentración final	Volumen muestra (μl)
Agua estéril	-	2,9
Enzima MspA1I	1 U	0,1
Buffer IV	1X	2
Total	-	5
Producto amplificado	-	15
Volumen final	-	20

2.3 GENOTIPADO DE rs231775 EN EL GEN CTLA4

Tabla anexa 6. Protocolo de PCR para el genotipado del SNP rs231775 mediante RFLP.

Reactivos del MIX [stock]	Concentración final	Volumen muestra (μl)
Agua estéril	-	18,15
dNTPs (10 mM)	0,2 mM	0,5
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM	0,75
Buffer (10X)	1x	2,5
Cebador F rs23 10 μ M	10pmol	1
Cebador R rs23 10 μ M	10pmol	1
Enzima Immolasa (5 U/ μ l)	0,5 U	0,1
Totales	-	23
ADN (50 ng/μl)	100 ng	1
Volumen final	-	25

Tabla anexa 7. Condiciones de PCR para el genotipado del SNP rs231775 mediante RFLP.

	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Nº Ciclos</i>
Desnaturalización inicial	95°C	10 min	
Desnaturalización	95°C	30seg	
Anillamiento	58°C	30 seg	35 ciclos
Extensión	72°C	30 seg	
Extensión final	72°C	10 min	

Tabla anexa 8. Protocolo de digestión con enzima *BstEII* para el genotipado del SNP rs231775 mediante RFLP.

<i>Reactivos</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Volumen muestra (µl)</i>
Agua estéril	-	2,9
Enzima <i>BstEII</i>	1 U	0,1
Buffer IV	1X	2
Total	-	5
Producto amplificado	-	15
Volumen final	-	20

3. SELECCIÓN DE POLIMORFISMOS

Tabla anexa 9. Selección de SNPs en genes de procesamiento de miRNAs (continua).

	Gen	SNP	Alelos	Chr	Localización	Función	Razón de selección
1	<i>GEMIN3</i>	rs197412	T>C	1	112308953	no sinónimos	NS, BIB(93, 94, 96, 145-148)
2	<i>GEMIN3</i>	rs197414	C>A	1	112309123	no sinónimos	NS, BIB (93, 94, 145-148)
3	<i>GEMIN3</i>	rs197388	T>A	1	112297482	aguas arriba	NS, BIB(93, 94, 145-148)
4	<i>GEMIN3</i>	rs563002	T>C	1	112317135	aguas abajo	BIB(96)
5	<i>CNOT2</i>	rs10506586	C>A	12	70715490	no sinónimos	NS, SR
6	<i>TNRC6A</i>	rs6497759	G>A	16	24801737	no sinónimos	NS
7	<i>CNOT1</i>	rs11644694	G>A	16	58557342	no sinónimos	NS, SR
8	<i>CNOT1</i>	rs37060	C>T	16	58566304	intrónico	SR
9	<i>CNOT1</i>	rs11866002	C>T	16	58587737	sinónimos	SR
10	<i>GEMIN4</i>	rs1062923	T>C	17	649067	no sinónimos	NS, BIB(93, 94, 146-148)
11	<i>GEMIN4</i>	rs2740348	G>C	17	649935	no sinónimos	NS, BIB(93, 94, 146-148)
12	<i>GEMIN4</i>	rs34610323	C>T	17	648546	no sinónimos	NS
13	<i>GEMIN4</i>	rs3744741	C>T	17	649232	no sinónimos	NS, BIB(93, 94, 145-148)
14	<i>GEMIN4</i>	rs7813	C>T	17	648186	no sinónimos	NS, BIB(93, 94, 96, 145-148)
15	<i>GEMIN4</i>	rs910924	C>T	17	655920	5'UTR	5UTR, BIB(93, 94, 145, 146)
16	<i>CNOT3</i>	rs42318	G>A	19	54657069	no sinónimos	NS
17	<i>TNRC6B</i>	rs2413621	T>C	22	40673999	intrónico	SR
18	<i>TNRC6B</i>	rs9611280	G>A	22	40552119	no sinónimos	NS, SR
19	<i>TNRC6B</i>	rs4821943	A>G	22	40722745	3'UTR	MIRTS
20	<i>TNRC6B</i>	rs470113	A>G	22	40729614	3'UTR	MIRTS
21	<i>TNRC6B</i>	rs139919	T>C	22	40726183	3'UTR	MIRTS
22	<i>DGCR8</i>	rs35987994	T>C	22	20074006	no sinónimos	NS
23	<i>DGCR8</i>	rs417309	G>A	22	20098544	3'UTR	3UTR, BIB(93, 94, 145, 146)
24	<i>DGCR8</i>	rs3757	G>A	22	20099331	3'UTR	MIRTS, BIB(93, 94, 96, 145-148)
25	<i>DGCR8</i>	rs1640299	T>G	22	20098359	3'UTR	BIB(93, 94, 145-148)
26	<i>DGCR8</i>	rs9606248	A>G	22	20087539	intrónico	BIB(96)
27	<i>GEMIN5</i>	rs1974777	A>G	5	154291409	no sinónimos	NS
28	<i>GEMIN5</i>	rs6865950	G>A	5	154275786	no sinónimos	NS
29	<i>GEMIN5</i>	rs816736	T>C	5	154271948	sinónimos	SR
30	<i>CNOT6</i>	rs6877400	T>C	5	179996111	sinónimos	SR
31	<i>CNOT6</i>	rs11738060	T>A	5	180004154	3'UTR	MIRTS

3UTR: Regulación 3'UTR; 5UTR: Regulación 5'UTR; BIB: Bibliográfico; MIRTS: Diana de miRNA; NS: No sinónimo; SR: Regulación splicing; UR: Regulación aguas arriba.

Tabla anexa 9. Selección de SNPs en genes de procesamiento de miRNAs (continúa).

	Gen	SNP	Alelos	Cr	Localizacion	Función	Razón de selección
32	<i>DROSHA</i>	rs55656741	G>A	5	31515657	no sinónimos	NS, SR
33	<i>DROSHA</i>	rs10719	C>T	5	31401447	sinónimos	SR, BIB(93, 94, 146, 148)
34	<i>DROSHA</i>	rs6877842	G>C	5	31532638	intrónico	BIB(93, 94, 146-148)
35	<i>DROSHA</i>	rs2287584	T>C	5	31423007	sinónimos	SR, BIB(96)
36	<i>DROSHA</i>	rs4867329	A>C	5	31435627	intrónico	BIB(149)
37	<i>DROSHA</i>	rs7719666	C>T	5	31520778	intrónico	BIB(96, 150)
38	<i>DROSHA</i>	rs10035440	T>C	5	31539463	intrónico	BIB(96)
39	<i>DROSHA</i>	rs17408716	A>G	5	31467952	intrónico	BIB(96)
40	<i>DROSHA</i>	rs3792830	T>C	5	31416248	intrónico	BIB(96, 150)
41	<i>DROSHA</i>	rs493760	T>C	5	31437040	intrónico	BIB(86)
42	<i>DROSHA</i>	rs7735863	G>A	5	31486540	intrónico	BIB(86, 150)
43	<i>DROSHA</i>	rs6884823	G>A	5	31491121	intrónico	BIB(149)
44	<i>DROSHA</i>	rs639174	C>T	5	31433647	intrónico	BIB(149)
45	<i>DROSHA</i>	rs3805500	T>C	5	31462977	intrónico	BIB(149)
46	<i>SMAD5</i>	rs3764941	A>C	5	135469527	no sinónimos	NS, SR
47	<i>SMAD5</i>	rs3764942	G>A	5	135469500	intrónico	SR
48	<i>XPO5</i>	rs1106841	A>C	6	43496662	sinónimos	SR
49	<i>XPO5</i>	rs34324334	C>T	6	43535018	no sinónimos	NS, SR
50	<i>XPO5</i>	rs2257082	C>T	6	43492578	sinónimos	SR, BIB(149)
51	<i>XPO5</i>	rs2227301	G>A	6	43485283	aguasabajo	BIB(149)
52	<i>XPO5</i>	rs7755135	C>T	6	43490809	3'UTR	MIRTS
53	<i>CNOT4</i>	rs1003226	T>C	7	135046552	3'UTR	SR
54	<i>CNOT4</i>	rs3812265	C>T	7	135048804	no sinónimos	NS, SR
55	<i>CNOT4</i>	rs3763425	C>T	7	135195320	aguasarriba	UR
56	<i>SND1</i>	rs17151639	A>G	7	127637816	no sinónimos	NS
57	<i>SND1</i>	rs322825	C>T	7	127721507	sinónimos	SR
58	<i>SND1</i>	rs3823994	T>A	7	127669857	intrónico	SR
59	<i>SND1</i>	rs17676986	C>T	7	127636958	intrónico	TR
60	<i>RAN</i>	rs14035	C>T	12	131361241	3'UTR	MIRTS, BIB(93, 94, 145-147)

3'UTR: Regulación 3'UTR; 5'UTR: Regulación 5'UTR; BIB: Bibliográfico; MIRTS: Diana de miRNA; NS: No sinónimo; SR: Regulación splicing; UR: Regulación aguasarriba.

Tabla anexa 9. Selección de SNPs en genes de procesamiento de miRNAs.

	Gen	SNP	Alelos	Cromosoma	Localizacion	Función	Razón de selección
61	<i>RAN</i>	rs11061209	G>A	12	131364988	aguasabajo	BIB(149)
62	<i>DICER</i>	rs3742330	A>G	14	95553362	3'UTR	BIB(93, 94, 145, 146, 148)
63	<i>DICER</i>	rs13078	T>A	14	95556747	3'UTR	3UTR, BIB(93, 94, 145-148)
64	<i>DICER</i>	rs1209904	C>T	14	95563712	intrónico	BIB(86)
65	<i>DICER</i>	rs1057035	T>C	14	95554142	3'UTR	MIRTS
66	<i>TRBP</i>	rs784567	C>T	12	53894465	aguasarriba	BIB(93, 94, 145, 146, 148)
67	<i>EIF2C1</i>	rs636832	G>A	1	36363475	intrónico	BIB(93, 94, 145, 146, 148)
68	<i>EIF2C1</i>	rs595961	A>G	1	36367780	intrónico	BIB(93, 94, 145-148)
69	<i>EIF2C2</i>	rs4961280	C>A	1	141647414	aguasarriba	UR, BIB(93, 94, 145, 146, 148)
70	<i>EIF2C2</i>	rs2293939	G>A	1	141551407	sinónimos	SR
71	<i>EIF2C2</i>	rs2292778	C>T	1	141568622	sinónimos	SR
72	<i>HIWI</i>	rs1106042	G>A	12	130841638	no sinónimos	NS, SR, BIB(86, 93, 94, 146, 148)

3UTR: Regulación 3'UTR; 5UTR: Regulación 5'UTR; BIB: Bibliográfico; MIRTS: Diana de miRNA; NS: No sinónimo; SR: Regulación splicing; UR: Regulación aguasarriba.

Tabla anexa 10. Selección de polimorfismos en pre-miRNAs (continua).

	Gen	SNP	Alelos	Cromosoma	Localización
1	hsa-mir-449b	rs10061133	A>G	5	54466544
2	mir-1302-4	rs10173558	T>C	2	208133995
3	hsa-mir-5196	rs10406069	G>A	19	35836530
4	hsa-mir-4745	rs10422347	C>T	19	804959
5	hsa-mir-548ae-2	rs10461441	T>T	5	57825920
6	hsa-mir-2053	rs10505168	A>G	8	113655752
7	hsa-mir-4700	rs1055070	T>G	12	121161048
8	hsa-mir-943	rs1077020	T>T	4	1988193
9	hsa-mir-6074	rs10878362	T>T	12	66417493
10	hsa-mir-544b	rs10934682	T>G	3	124451312
11	hsa-mir-603	rs11014002	T>T	10	24564653
12	hsa-mir-1343	rs11032942	T>T	11	34963459
13	mir-624	rs11156654	T>A	14	31483955
14	hsa-mir-5579	rs11237828	T>T	11	79133220
15	hsa-mir-1265	rs11259096	T>C	10	14478618
16	hsa-mir-196a-2	rs11614913	C>T	12	54385599
17	hsa-mir-548at	rs11651671	T>T	17	40646803
18	hsa-mir-5092	rs11713052	C>G	3	124870376
19	hsa-mir-4792	rs11714172	T>G	3	24562877
20	hsa-mir-3192	rs11907020	T>C	20	18451325
21	hsa-mir-4653	rs11983381	A>G	7	100802786
22	hsa-mir-548a-1	rs12197631	T>T	6	18572056
23	hsa-mir-202	rs12355840	T>C	10	135061112
24	hsa-mir-3117	rs12402181	G>A	1	67094171
25	hsa-mir-1269b	rs12451747	T>T	17	12820632
26	hsa-mir-4744	rs12456845	T>C	18	46576058
27	hsa-mir-4433	rs12473206	T>T	2	64567916
28	hsa-mir-4274	rs12512664	A>G	4	7461769
29	hsa-mir-4277	rs12523324	T>T	5	1708983
30	hsa-mir-4293	rs12780876	T>A	10	14425204
31	hsa-mir-612	rs12803915	G>A	11	65211979
32	hsa-mir-4309	rs12879262	G>C	14	103006047
33	hsa-mir-300	rs12894467	C>T	14	101507727
34	hsa-mir-1294	rs13186787	T>T	5	153726769
35	hsa-mir-3152	rs13299349	G>A	9	18573360
36	hsa-mir-548ac	rs1414273	T>T	1	117102649
37	hsa-mir-3175	rs1439619	A>C	15	93447631
38	hsa-mir-5007	rs1572687	C>T	13	55748673
39	hsa-mir-3612	rs1683709	C>T	12	128778703
40	hsa-mir-5700	rs17022749	T>T	12	94955603
41	hsa-mir-2110	rs17091403	C>T	10	115933905
42	hsa-mir-4422	rs17111728	T>C	1	55691384
43	mir-1908	rs174561	T>C	11	61582708
44	hsa-mir-3143	rs17737028	A>G	6	27115467

Tabla anexa 10. Selección de polimorfismos en pre-miRNAs (continua).

	Gen	SNP	Alelos	Cromosoma	Localización
45	hsa-mir-633	rs17759989	A>G	17	61021611
46	hsa-mir-3652	rs17797090	G>A	12	104324266
47	hsa-mir-4733	rs17885221	C>T	17	29421443
48	hsa-mir-5197	rs2042253	A>G	5	143059433
49	hsa-mir-605	rs2043556	A>G	10	53059406
50	hsa-mir-4511	rs2060455	T>T	15	66011630
51	hsa-mir-3620	rs2070960	C>T	1	228284991
52	hsa-mir-1206	rs2114358	T>C	8	129021179
53	hsa-mir-4494	rs215383	G>A	12	47758032
54	hsa-mir-3130-1	rs2241347	T>T	2	207647981
55	hsa-mir-4707	rs2273626	C>A	14	23426182
56	hsa-mir-492	rs2289030	C>G	12	95228286
57	hsa-mir-1229	rs2291418	C>T	5	179225324
58	hsa-mir-564	rs2292181	G>C	3	44903434
59	hsa-mir-149	rs2292832	T>T	2	241395503
60	hsa-mir-604	rs2368392	C>T	10	29834003
61	hsa-mir-4432	rs243080	C>T	2	60614572
62	hsa-mir-4636	rs257095	A>G	5	9053945
63	hsa-mir-1208	rs2648841	C>A	8	129162433
64	hsa-mir-3183	rs2663345	T>T	17	925764
65	hsa-mir-4804	rs266435	C>G	5	72174432
66	hsa-mir-6128	rs2682818	C>A	12	81329536
67	hsa-mir-4308	rs28477407	C>T	14	55344901
68	hsa-mir-378d-1	rs28645567	G>A	4	5925054
69	hsa-mir-4472-1	rs28655823	G>C	8	143257760
70	hsa-mir-1255a	rs28664200	T>C	4	102251501
71	hsa-mir-146a	rs2910164	G>C	5	159912418
72	hsa-mir-5695	rs2967897	G>G	19	13031210
73	hsa-mir-4803	rs3112399	T>A	5	71465361
74	hsa-mir-577	rs34115976	C>G	4	115577997
75	hsa-mir-4669	rs35196866	T>T	9	137271318
76	hsa-mir-2278	rs356125	G>A	9	97572244
77	hsa-mir-5189	rs35613341	C>G	16	88535407
78	hsa-mir-6076	rs35650931	G>C	14	50433227
79	hsa-mir-449c	rs35770269	A>T	5	54468124
80	hsa-mir-3166	rs35854553	A>T	11	87909673
81	hsa-mir-3936	rs367805	G>A	5	131701279
82	hsa-mir-6499	rs3734050	C>T	5	150901699
83	hsa-mir-499a	rs3746444	T>C	20	33578251
84	hsa-mir-5090	rs3823658	G>A	7	102106201
85	hsa-mir-4751	rs4112253	C>G	19	54786022
86	hsa-mir-96	rs41274239	A>G	7	129414574
87	hsa-mir-187	rs41274312	G>A	18	33484792
88	hsa-mir-154	rs41286570	G>G	14	101526127

Tabla anexa 10. Selección de polimorfismos en pre-miRNAs (continua).

	Gen	SNP	Alelos	Cromosoma	Localización
89	hsa-mir-216a	rs41291179	A>T	2	56216090
90	hsa-mir-122	rs41292412	C>T	18	56118358
91	hsa-mir-3135b	rs4285314	T>T	6	32717702
92	hsa-mir-548ap	rs4414449	T>C	15	86368898
93	hsa-mir-6084	rs45530340	C>C	1	20960230
94	hsa-mir-548ap	rs4577031	A>T	15	86368959
95	hsa-mir-4268	rs4674470	T>C	2	220771223
96	hsa-mir-941-1	rs4809383	C>T	20	62550780
97	hsa-mir-548j	rs4822739	C>G	22	26951185
98	hsa-mir-5680	rs487571	T>T	8	103137693
99	hsa-mir-595	rs4909237	C>T	7	158325503
100	hsa-mir-608	rs4919510	C>G	10	102734778
101	hsa-mir-548al	rs515924	A>G	11	74110353
102	hsa-mir-3671	rs521188	A>G	1	65523519
103	hsa-mir-4424	rs56088671	T>T	1	178646884
104	hsa-mir-323b	rs56103835	T>C	14	101522556
105	hsa-mir-548aw	rs56195815	T>T	9	135821099
106	hsa-mir-5189	rs56292801	G>A	16	88535341
107	hsa-mir-1283-1	rs57111412	T>T	19	54191743
108	hsa-mir-559	rs58450758	T>T	2	47604866
109	hsa-mir-656	rs58834075	C>T	14	101533093
110	hsa-mir-888	rs5965660	T>G	X	145076302
111	hsa-mir-3928	rs5997893	G>A	22	31556103
112	hsa-mir-4762	rs60308683	T>T	22	46156446
113	hsa-mir-4326	rs6062431	G>C	20	61918164
114	hsa-mir-4467	rs60871950	G>A	7	102111936
115	hsa-mir-596	rs61388742	T>C	8	1765425
116	hsa-mir-3922	rs61938575	G>A	12	104985443
117	hsa-mir-412	rs61992671	G>A	14	101531854
118	hsa-mir-4772	rs62154973	C>T	2	103048780
119	hsa-mir-585	rs62376935	C>T	5	168690635
120	hsa-mir-4482	rs641071	T>T	10	106028157
121	hsa-mir-3679	rs6430498	G>A	2	134884700
122	hsa-mir-423	rs6505162	T>T	17	28444183
123	hsa-mir-646	rs6513496	T>C	20	58883534
124	hsa-mir-4731	rs66507245	T>T	17	15154966
125	hsa-mir-3622a	rs66683138	T>T	8	27559214
126	hsa-mir-6128	rs67042258	G>A	11	56511354
127	hsa-mir-3167	rs670637	T>T	11	126858392
128	hsa-mir-4642	rs67182313	A>G	6	44403438
129	hsa-mir-4431	rs6726779	T>C	2	52929680
130	MIR3910-1, MIR3910-2	rs67339585	T>T	9	94398581
131	hsa-mir-3135a	rs6787734	T>T	3	20179097

Tabla anexa 10. Selección de polimorfismos en pre-miRNAs (continua).

	Gen	SNP	Alelos	Cromosoma	Localización
132	hsa-mir-4305	rs67976778	T>T	13	40238175
133	hsa-mir-3144	rs68035463	C>A	6	120336327
134	hsa-mir-1255b-1	rs6841938	T>T	4	36428048
135	hsa-mir-3683	rs6977967	A>G	7	7106636
136	hsa-mir-3686	rs6997249	T>T	8	130496365
137	hsa-mir-4427	rs701213	T>T	1	233759918
138	hsa-mir-378h	rs702742	A>G	5	154209024
139	hsa-mir-548aj-2	rs7070684	T>T	10	12172775
140	hsa-mir-1283-2	rs71363366	C>G	19	54261549
141	hsa-mir-140	rs7205289	C>C	16	69967005
142	hsa-mir-2117	rs7207008	T>A	17	41522213
143	hsa-mir-4741	rs7227168	C>T	18	20513374
144	hsa-mir-3188	rs7247237	C>T	19	18392894
145	hsa-mir-3689f	rs72502717	T>T	9	137742597
146	hsa-mir-105-2	rs72631816	T>A	X	151562938
147	hsa-mir-222	rs72631825	G>A	X	45606471
148	hsa-mir-16-1	rs72631826	T>T	13	50623143
149	hsa-mir-106b	rs72631827	G>G	7	99691652
150	hsa-mir-323b	rs72631831	G>G	7	1062656
151	hsa-mir-183	rs72631833	G>G	7	129414804
152	hsa-mir-3972	rs72646786	C>T	1	17604437
153	hsa-mir-3976	rs72855836	G>A	18	5840810
154	hsa-mir-4999	rs72996752	A>G	19	8454236
155	hsa-mir-4459	rs73112689	T>T	5	53371399
156	hsa-mir-1178	rs7311975	T>C	12	120151493
157	hsa-mir-647	rs73147065	T>T	20	62574006
158	hsa-mir-4532	rs73177830	T>T	20	56470471
159	hsa-mir-548h-4	rs73235381	T>T	8	26906402
160	hsa-mir-1269a	rs73239138	G>A	4	67142620
161	hsa-mir-4739	rs73410309	T>T	17	77681036
162	hsa-mir-4474	rs74428911	G>T	9	20502274
163	hsa-mir-6504	rs74469188	T>C	16	81644970
164	hsa-mir-3615	rs745666	C>G	17	72744798
165	hsa-mir-518d	rs74704964	C>T	19	54238208
166	hsa-mir-2682	rs74904371	C>T	1	98510847
167	hsa-mir-5702	rs74949342	C>G	2	227523436
168	hsa-mir-4719	rs7500280	T>T	16	76902847
169	hsa-mir-4477a	rs75019967	A>A	9	68415338
170	hsa-mir-4742	rs7522956	A>C	1	224585958
171	hsa-mir-520f	rs75598818	G>A	19	54185492
172	hsa-mir-944	rs75715827	T>C	3	189547735
173	hsa-mir-4298	rs75966923	C>A	11	1880730
174	hsa-mir-182	rs76481776	C>T	7	129410227

Tabla anexa 10. Selección de polimorfismos en pre-miRNAs.

	Gen	SNP	Alelos	Cromosoma	Localización
175	hsa-mir-4521	rs76800617	A>G	17	8090294
176	hsa-mir-1303	rs77055126	T>T	5	154065348
177	hsa-mir-4634	rs7709117	A>G	5	174178774
178	hsa-mir-576	rs77639117	A>T	4	110409933
179	hsa-mir-4743	rs78396863	G>C	18	46196971
180	hsa-mir-6075	rs78541299	G>A	5	1510904
181	hsa-mir-6083	rs78790512	G>A	3	124093220
182	hsa-mir-4789	rs78831152	C>T	3	175087408
183	hsa-mir-4786	rs78832554	G>A	2	240882476
184	hsa-mir-4481	rs7896283	A>G	10	12695177
185	hsa-mir-1307	rs7911488	A>G	10	105154089
186	hsa-mir-597	rs79397096	G>A	8	9599276
187	hsa-mir-3976	rs79512808	T>G	5	82136024
188	hsa-mir-5707	rs80128580	G>A	7	158384368
189	hsa-mir-3176	rs8054514	T>G	16	593277
190	hsa-mir-4520a	rs8078913	C>T	17	6558768
191	hsa-mir-4698	rs832733	T>T	12	47581629
192	hsa-mir-550a-3	rs850108	T>T	7	29720404
193	hsa-mir-4751	rs8667	G>A	19	50436371
194	hsa-mir-4671	rs877722	A>T	1	234442257
195	mir-27a	rs895819	T>C	19	13947292
196	hsa-mir-4519	rs897984	T>T	16	30886643
197	hsa-mir-5689	rs9295535	T>T	6	10439968
198	hsa-mir-3141	rs936581	G>A	5	153975576
199	hsa-mir-5186	rs9842591	C>A	3	151283691
200	hsa-mir-5680	rs9877402	A>G	3	120768492
201	hsa-mir-548h-3	rs9913045	T>T	17	13446924
202	MIR4302	seq_rs11048315	G>A	12	26026988
203	MIR3908	seq_rs111803974	T>T	12	124021017
204	MIR299, MIR380	seq_rs111906529	T>C	14	101489703
205	MIR520G	seq_rs112328520	C>T	19	54225501
206	mir-1282	seq_rs11269	G>G	15	44085909
207	MIR4532	seq_rs113808830	C>T	20	56470456
208	hsa-mir-4479	seq_rs116932476	G>A	9	139781193
209	MIR296	seq_rs117258475	G>A	20	57392686
210	hsa-mir-6717	seq_rs117650137	G>A	14	21491532
211	MIR3649	seq_rs117723462	T>G	12	1769533
212	MIR4436B2	seq_rs163642	T>T	2	111042483
213	MIR3689	seq_rs62571442	A>G	9	137742124

RESULTADOS

1. VALIDACIÓN DE SNPS PREVIAMENTE ASOCIADOS A SUSCEPTIBILIDAD A OS

Después de realizar la búsqueda de los estudios de genes candidatos centrados en la susceptibilidad del OS, observamos que los únicos SNPs asociados y replicados en al menos dos estudios fueron rs2279744 y rs1690916 en el gen *MDM2* y rs231775 en el gen *CTLA4*. Esto sugiere que estos 3 SNPs son, hasta el momento, los únicos SNPs que pueden ser “marcadores” de susceptibilidad a desarrollar OS; por lo que, los consideramos para su validación.

1.1 ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE *MDM2* rs1690916 Y rs2279744 CON EL RIESGO A DESARROLLAR OS

Con el objetivo de determinar si los polimorfismos rs1690916 y rs2279744 del gen *MDM2* incrementan el riesgo a desarrollar OS se realizó un estudio de asociación caso-control en dos poblaciones europeas (española y eslovena).

1.1.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se analizaron un total de 139 casos de OS (n= 99 españoles y n=40 eslovenos) y sus correspondientes controles (n=167 y n=92). La edad media de los pacientes fue de 14,69 años (rango 3-69 años). Se observó un mayor número de casos en hombres que en mujeres en una proporción 1,16:1 (Tabla 12).

Tabla 12. Distribución de edad y género en la población de pacientes de OS y controles en el estudio del gen *MDM2*.

	Total	Controles	Casos
Participantes (n)	398	259	139
Población (n;%)			
España	266 (66,83)	167 (64,48)	99 (71,22)
Eslovenia	132 (33,17)	92 (35,52)	40 (28,78)
Edad (media; ds)*			
España	-	42,29 (9,97)	14,69 (5,13)
Eslovenia	-	46,52 (9,24)	23 (15,89)
Sexo (m/h/nd)*			
España	100/145/21	61/91/15	39/54/6
Eslovenia	52/79/1	31/61	21/18/1

Abreviaturas: n, número de individuos; ds, desviación estándar; m, mujeres; h, hombres; nd, no disponible. * Los datos de edad y sexo no estuvieron disponibles en todos los individuos

1.1.2 ÉXITO DE GENOTIPADO

El éxito de genotipado fue del 96,5% para el polimorfismo rs1690916 (126 pacientes y 258 controles) y del 94,5%, para rs2279744 (120 pacientes y 256 controles). Las frecuencias genotípicas de la población control estaban en EHW ($p > 0,05$).

1.1.3 ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE rs1690916 Y RIESGO DE OS

El estudio de asociación entre el SNP rs1690916 del gen *MDM2* y el riesgo de OS por frecuencias alélicas no mostró ningún resultado estadísticamente significativo, ni en la población española ni en eslovena. Cuando se analizaron las dos poblaciones en conjunto tampoco se obtuvo ninguna asociación estadísticamente significativa (Tabla 13).

Tabla 13. Estudio de asociación por frecuencias alélicas entre el polimorfismo rs1690916 del gen *MDM2* y el riesgo a desarrollar OS.

Población	AM	MAF	Alelo	N (%) control	N (%) casos	OR (IC 95%)	P
España	A	0,34	G	220 (65,9)	125 (63,1)	1,13 (0,78-1,63)	0,57
			A	114 (34,1)	73 (36,9)		
			Total	334 (100)	198 (100)		
Eslovenia	A	0,43	G	103 (56,6)	23 (42,6)	1,76 (0,95-3,25)	0,09
			A	79 (43,4)	31 (57,4)		
			Total	182 (100)	54 (100)		
Todas	A	0,37	G	323 (62,4)	148 (58,73)	1,18 (0,86-1,62)	0,30
			A	193 (37,26)	104 (4,13)		
			Total	516 (100)	252 (100)		

Abreviaturas: AM, alelo de menor frecuencia en controles; MAF, frecuencia del alelo menor; OR, Odds Ratio; IC, Intervalo de confianza.

El análisis de asociación por frecuencias genotípicas no mostró resultados significativos ni en la población española ni en la eslovena ($p > 0,05$, bajo todos los modelos genéticos analizados). Cuando se analizaron las poblaciones en conjunto tampoco se obtuvo ninguna asociación estadísticamente significativa (Tabla 14).

Tabla 14. Estudio de asociación por frecuencias genotípicas entre el polimorfismo rs1690916 del gen *MDM2* y el riesgo a desarrollar OS.

Población	AM	Genotipo	N(%)control	N (%) casos	OR (IC 95%) cod	P cod	OR(IC 95%) rec	P rec	OR(IC 95%) dom	P dom	OR(IC 95%) log	P log
España	A	GG	73 (43,7)	38 (38,4)	1							
		GA	74 (44,3)	49 (49,5)	1,27 (0,75-2,17)	0,68	GG/GA	0,97	GG			
		AA	20 (12,0)	12 (12,1)	1,15 (0,51-2,61)		AA 1,01 (0,47-2,17)		GA/AA 1,25 (0,75-2,07)	0,39	1,13 (0,78-1,63)	0,52
		Total	167 (100)	99 (100)								
Eslovenia	A	GG	26 (28,6)	3 (11,1)	1							
		GA	51 (56,0)	17 (63,0)	2,89 (0,78-10,76)	0,11	GG/GA	0,22	GG			
		AA	14 (15,4)	7 (25,9)	4,33 (0,97-19,43)		AA 1,92 (0,69-5,40)		GA/AA 3,20 (0,89-11,55)	0,05	1,98 (0,99-3,96)	0,05
		Total	91 (100)	27 (100)								
Todas	A	GG	99 (38,4)	41 (32,5)	1							
		GA	125 (48,4)	66 (52,4)	1,27 (0,80-2,04)	0,53	GG/GA	0,61	GG			
		AA	34 (13,2)	19 (15,1)	1,35 (0,69-2,63)		AA 1,17 (0,64-2,15)		GA/AA 1,29 (0,82-2,02)	0,26	1,19 (0,86-1,63)	0,29
		Total	258 (100)	126 (100)								

Abreviaturas: AM, alelo de menor frecuencia en controles; OR, Odds Ratio; IC, Intervalo de confianza; cod, codominante; dom, dominante; rec, recesivo; log, log-aditivo.

1.1.4 ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE rs2279744 Y RIESGO DE OS

El estudio de asociación entre el SNP rs2279744 y el riesgo de OS por frecuencias alélicas (Tabla 15) no mostró ningún resultado significativo, ni en la población española ni en la eslovena. Cuando se analizaron ambas poblaciones en conjunto, tampoco se obtuvo ninguna asociación estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

Tabla 15. Estudio de asociación por frecuencias alélicas entre el polimorfismo rs2279744 del gen *MDM2* y el riesgo a desarrollar OS.

Población	AM	MAF	Alelo	N (%) control	N (%) casos	OR (IC 95%)	P
España	G	0,38	T	202 (61,6)	125 (66,5)	0,81 (0,55-1,18)	0,30
			G	126 (38,4)	63 (33,5)		
			Total	328 (100)	188 (100)		
Eslovenia	G	0,36	T	118 (64,1)	36 (69,2)	0,79 (0,38-1,60)	0,62
			G	66 (35,9)	16 (30,8)		
			Total	184 (100)	52 (100)		
Todas	G	0,38	T	320 (62,5)	161 (67,1)	0,81(0,58-1,14)	0,25
			G	192 (37,5)	79 (32,9)		
			Total	512 (100)	240 (100)		

Abreviaturas: AM, alelo de menor frecuencia en controles; MAF, frecuencia del alelo menor; OR, Odds Ratio; IC, Intervalo de confianza.

El análisis de asociación por frecuencias genotípicas tampoco mostró resultados significativos, ni en la población española, ni en la eslovena, ni en la población en conjunto ($p > 0,05$, bajo todos los modelos de herencia estudiados) (Tabla 16).

Tabla 16. Estudio de asociación por frecuencias genotípicas entre el polimorfismo rs2279744 del gen *MDM2* y el riesgo a desarrollar OS.

Población	AM	Genotipo	N (%) control	N (%) casos	OR (IC 95%) cod	P cod	OR(IC 95%) rec	P rec	OR(IC 95%) dom	P dom	OR(IC 95%) log	P log
España	G	TT	65 (39,6)	44 (46,8)	1	0,53	TT/GT GG 0,81 (0,40-1,67)	0,57	TT GT/GG 0,75 (0,45-1,24)	0,26	0,82 (0,57-1,18)	0,29
		GT	72 (43,9)	37 (39,4)	0,76 (0,44-1,32)							
		GG	27 (16,5)	13 (13,8)	0,71 (0,33-1,53)							
		Total	164 (100)	94 (100)								
Eslovenia	G	TT	40 (43,5)	11 (42,3)	1	0,19	TT/GT GG 0,22 (0,03-1,78)	0,09	TT GT/GG 1,05 (0,43-2,53)	0,92	0,80 (0,42-1,54)	0,50
		GT	38 (41,3)	14 (53,8)	1,34 (0,54-3,31)							
		GG	14 (15,2)	1 (3,8)	0,26 (0,03-2,20)							
		Total	92 (100)	26 (100)								
Todas	G	TT	105 (41)	55 (45,8)	1	0,46	TT/GT GG 0,69 (0,36-1,33)	0,25	TT GT/GG 0,82(0,53-1,27)	0,38	0,83 (0,61-1,13)	0,23
		GT	110 (43)	51 (42,5)	0,89 (0,56-1,41)							
		GG	41 (16)	14 (11,7)	0,65 (0,33-1,30)							
		Total	256 (100)	120 (100)								

Abreviaturas: AM, alelo de menor frecuencia en controles; OR, Odds Ratio; IC, Intervalo de confianza; cod, codominante; dom, dominante; rec, recesivo; log, log-aditivo.

En resumen, no detectamos asociación entre los polimorfismos rs1690916 y rs2279744 del gen *MDM2* y el riesgo a desarrollar OS. Este resultado contradecía resultados previamente publicados en la literatura (33, 35), además de contradecir los resultados obtenidos en un MA que analizaba estos dos SNPs (151).

Por esta razón, decidimos realizar una revisión crítica de todos los artículos que estudiaban los polimorfismos rs1690916 y rs2279744 en *MDM2* y el riesgo a desarrollar OS y hacer un nuevo MA de todos los estudios publicados hasta el momento añadiendo nuestras poblaciones española y eslovena.

1.2 REVISIÓN SISTEMÁTICA Y META-ANÁLISIS SOBRE LA IMPLICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE *MDM2* rs1690916 Y rs2279744 EN EL RIESGO A DESARROLLAR OS

1.2.1 REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA IMPLICACIÓN DE LOS SNPS rs1690916 Y rs2279744 EN EL RIESGO A DESARROLLAR OS

La búsqueda bibliográfica con las bases de datos *Pubmed* y *Scopus* permitió identificar un total de 1371 publicaciones. Después de eliminar las duplicaciones se obtuvieron 838 publicaciones. Tras revisar los resúmenes de estas publicaciones se descartaron 785 porque no cumplían los criterios de inclusión, quedando un total de 53 artículos de los que se realizó una lectura completa. De éstos, se identificaron un total de 4 artículos que específicamente estudiaban el polimorfismo rs1690916 y/o el polimorfismo rs2279744 y el riesgo de OS (Figura 19).

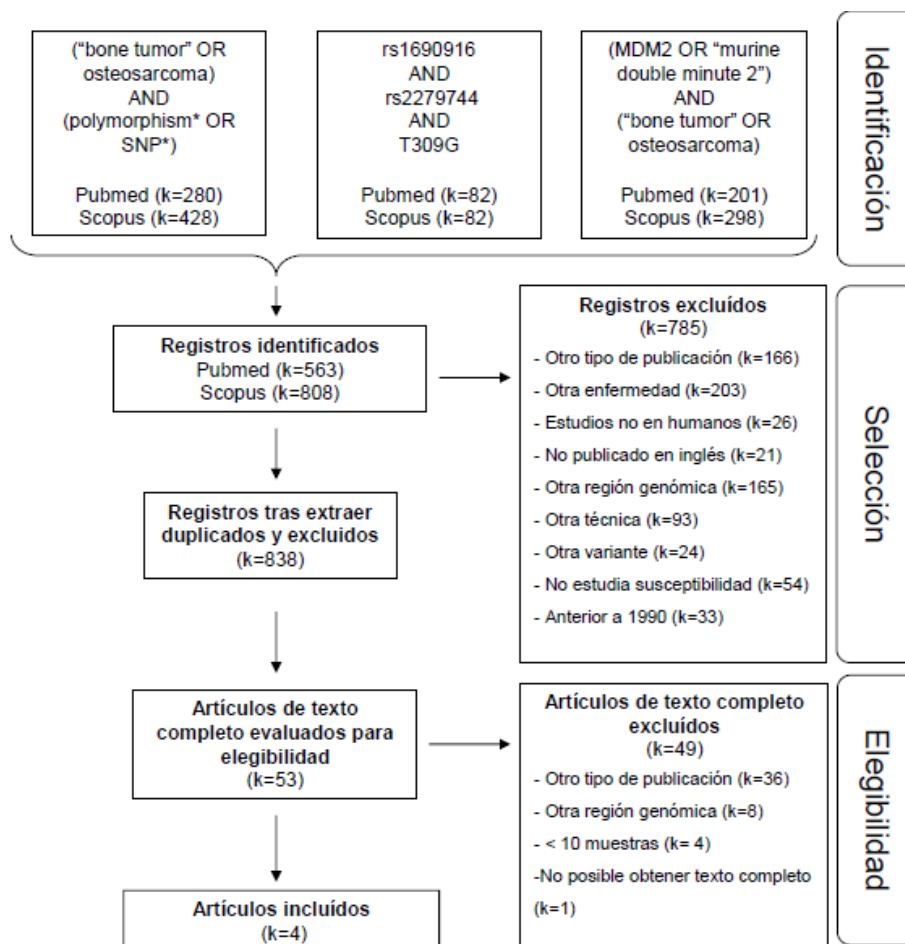


Figura 19. Diagrama de flujo de la selección de estudios.

1.2.2 META-ANÁLISIS

El MA sobre la implicación de los polimorfismos rs1690916 y rs2279744 en el riesgo de OS incluyó un total de 6 poblaciones, procedentes de los 4 artículos obtenidos de la revisión sistemática (rusa, americana, australiana e italiana) y del estudio de asociación previo (española y eslovena). Para el rs1690916 se obtuvieron datos de las poblaciones rusa, americana, española y eslovena y para el rs2279744 americana, australiana, italiana, española y eslovena.

1.2.2.1 Meta-análisis del SNP rs1690916

El MA del SNP rs1690916 incluyó las poblaciones rusa, americana, española y eslovena. La distribución genotípica de los controles en cada estudio estuvo en EHW ($p > 0,05$). Todos los estudios incluidos superaron la escala de calidad (valor > 5) (Tabla anexa 1).

El análisis de asociación por frecuencias alélicas mostró que el SNP rs1690916 estaba asociado con el riesgo a desarrollar OS únicamente en la población americana ($p = 0,002$) (Tabla 17). En esta población, el alelo A disminuía el riesgo de OS (OR=0,61; 95%IC: 0,45-0,84).

Tabla 17. Estudio de asociación por frecuencias alélicas entre el polimorfismo rs1690916 del gen *MDM2* y el riesgo a desarrollar OS en los estudios incluidos en el MA.

Población	N _{control}	N _{casos}	AM	Fr _{control}	Fr _{casos}	OR (IC 95%)	P	Ref	Año
España	167	99	A	0,34	0,37	1,13 (0,78-1,63)	0,57		2015 (PE)
Eslovenia	91	27	A	0,43	0,57	1,76 (0,95-3,25)	0,08		2015 (PE)
Rusia	86	24	A	0,47	0,31	0,51 (0,26-1,01)	0,06	(36)	2012
EEUU	1416	96	A	0,42	0,31	0,61 (0,45-0,84)	0,002*	(35)	2011

Abreviaturas: AM: Alelo de menor frecuencia en controles, N; Número de individuos; OR, Odds Ratio; IC, Intervalo de confianza; Fr., frecuencia alélica, PE: Presente estudio, Ref: Referencia; *Valores significativos

En el análisis por frecuencias genotípicas, dos poblaciones (americana y rusa) mostraron resultados significativos (Tabla 18). En el caso de la población americana, rs1690916 fue significativo bajo todos los modelos de herencia estudiados. El resultado más significativo fue bajo el modelo log-aditivo (AA vs AG vs GG). El genotipo AA mostró una disminución del riesgo con un valor de OR=0,61 (95%IC: 0,45-0,84; $p = 0,002$). En el caso de la población rusa, los genotipos GA/AA disminuyeron el riesgo de OS bajo el modelo dominante (OR= 0,37; 95%IC: 0,14-0,93; $p = 0,04$).

Tabla 18. Estudio de asociación por frecuencias genotípicas entre el polimorfismo rs1690916 del gen *MDM2* y el riesgo a desarrollar OS en los estudios incluidos en el MA.

Población	AM	Genotipo	N(%) control	N(%) casos	OR (IC 95%) cod	P cod	OR(IC 95%) rec	P rec	OR(IC 95%) dom	P dom	OR(IC 95%) log	P log	Ref	Año
España	A	GG	73 (43,7)	38 (38,4)	1									2015 (PE)
		GA	74 (44,3)	49 (49,5)	1,27 (0,75-2,17)	0,67	GG/GA	0,97	GG	0,39	1,13 (0,78-1,63)	0,52		
		AA	20 (12,0)	12 (12,1)	1,15 (0,51-2,61)		AA 1,01 (0,47-2,17)		GA/AA 1,25 (0,75-2,07)					
		Total	167 (100)	99 (100)										
Eslovenia	A	GG	26 (28,6)	3 (11,1)	1									2015 (PE)
		GA	51 (56,0)	17 (63,0)	2,89 (0,78-10,76)	0,11	GG/GA	0,22	GG	0,05	1,98 (0,99-3,96)	0,05		
		AA	14 (15,4)	7 (25,9)	4,33 (0,97-19,43)		AA 1,92 (0,69-5,40)		GA/AA 3,20 (0,89-11,55)					
		Total	91 (100)	27 (100)										
Rusia	A	GG	23 (26,7)	12 (50,0)	1									(36) 2012
		GA	45 (52,3)	9 (37,5)	0,38 (0,14-1,04)	0,10	GG/GA	0,33	GG	0,04	0,51 (0,25-1,01)	0,05		
		AA	18 (20,9)	3 (12,5)	0,32 (0,08-1,31)		AA 0,54 (0,14-2,01)		GA/AA 0,37 (0,14- 0,93)					
		Total	86 (100)	24 (100)										
EEUU	A	GG	468 (33,1)	44 (45,8)	1									(35) 2011
		GA	691 (48,8)	44 (45,8)	0,68 (0,44-1,05)	0,006	GG/GA	0,008	G/G	0,01	0,61 (0,45-0,84)	0,002		
		AA	257 (18,1)	8 (8,3)	0,33 (0,15-0,71)		AA 0,41 (0,20-0,86)		GA/AA 0,58 (0,38-0,88)					
		Total	1416 (100)	96 (100)										

Abreviaturas: AM, alelo menor; OR, Odds Ratio; IC, Intervalo de confianza; cod, codominante; dom, dominante; rec, recesivo; log, log-aditivo, Ref, Referencia, PE: Presente estudio;

Por lo tanto, la población americana fue la única que mostró asociación con el riesgo a desarrollar OS bajo todos los modelos de herencia genética utilizados (Tabla 18).

En el meta-análisis por frecuencias alélicas, observamos que el alelo A aumentaba o disminuía el riesgo dependiendo de la población; en la española y eslovena el alelo A confería riesgo a desarrollar OS ($OR > 1$), mientras que en la rusa y la americana, confería protección ($OR < 1$). Con respecto al peso (valor W en el *forest plot* y representado por un mayor o menor tamaño del cuadro) del modelo alélico, las poblaciones americana (29,4 %) y española (28,2 %) fueron las que más peso tuvieron en el MA (Figura 20).

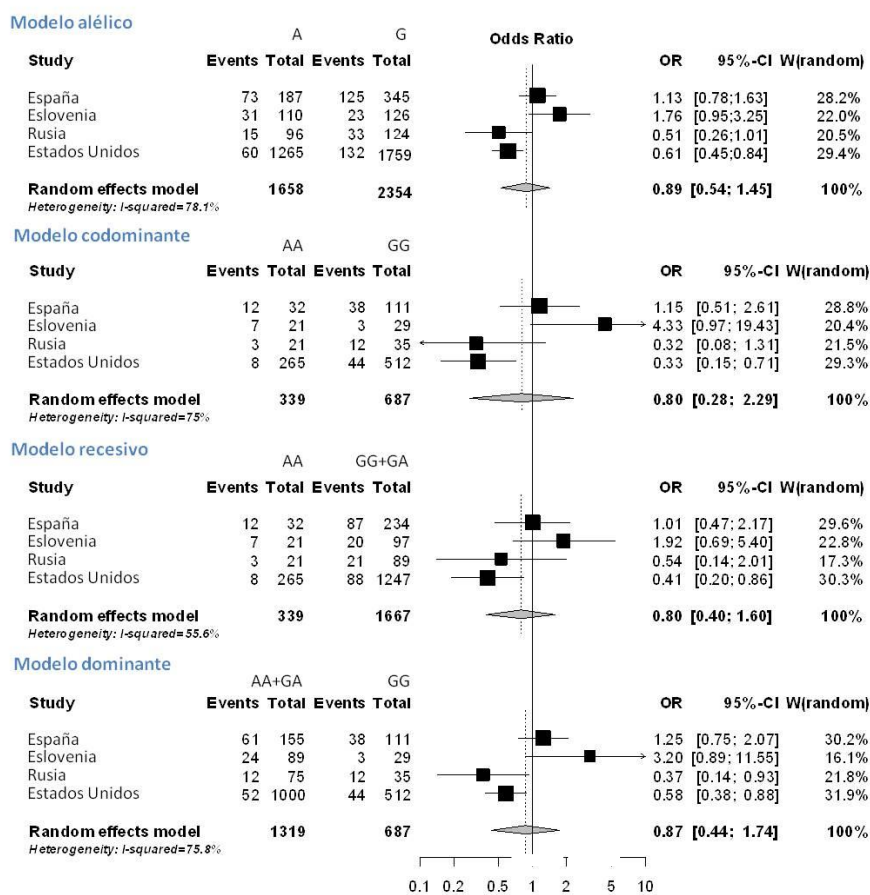


Figura 20. MA del polimorfismo rs1690916.

Para este polimorfismo, la heterogeneidad de los estudios incluidos fue alta (>75%) bajo los modelos alélico, codominante y dominante (Figura 20). Para averiguar qué estudio era el causante de esta heterogeneidad, se realizó un análisis de influencias. Este análisis reveló que ningún estudio afectaba significativamente al valor de OR global, lo que indicaba

que la heterogeneidad no estaba influenciada por ninguno de los estudios de manera individual (Tabla anexa 3).

El resultado final del MA indicó que el polimorfismo rs1690916 no estaba asociado con el riesgo a desarrollar OS bajo ningún modelo de herencia genético (Figura 20).

1.2.2.2 Meta-análisis del SNP rs2279744

El MA del SNP rs2279744 incluyó las poblaciones americana, australiana, italiana, española y eslovena. La distribución genotípica de los controles en cada estudio estuvieron en EHW ($p > 0,05$). El análisis de la calidad de los estudios mostró que el trabajo realizado por Ito et al (población australiana) no superaba la evaluación de calidad (valor= 4) debido a la poca calidad de los controles utilizados en su estudio (tabla anexa 2).

El análisis de asociación por frecuencias alélicas mostró que el SNP rs2279744 estaba asociado con el riesgo a desarrollar OS únicamente en la población italiana ($p = 0,002$) (Tabla 19). En esta población el alelo G incrementaba el riesgo de OS (OR=1,53; 95%IC: 1,16-2,02).

Tabla 19. Estudio de asociación por frecuencias alélicas entre el polimorfismo rs2279744 del gen *MDM2* y el riesgo a desarrollar OS en los estudios incluidos en el MA.

Población	N _{control}	N _{casos}	AM	Fr _{control}	Fr _{casos}	OR (IC 95%)	P	Ref	Año
España	164	94	G	0,38	0,33	0,81 (0,55-1,19)	0,29		2015 (PE)
Eslovenia	92	26	G	0,36	0,31	0,80 (0,38-1,60)	0,62		2015 (PE)
EEUU	1416	95	G	0,36	0,42	1,31 (0,96-1,78)	0,09	(35)	2011
Australia	37	17	G	0,3	0,38	1,46 (0,56-3,71)	0,39	(34)	2011
Italia	250	201	G	0,34	0,44	1,53 (1,16-2,02)	0,002*	(33)	2011

Abreviaturas: AM, alelo de menor frecuencia en controles; OR, Odds Ratio; IC, Intervalo de confianza; Fr., frecuencia alélica; Ref: Referencia. PE; Presente estudio. *Valores significativos

Del mismo modo, en el análisis por frecuencias genotípicas, únicamente la población italiana mostró resultados significativos bajo todos los modelos de herencia estudiados (OR>1; $p < 0,05$) (Tabla 20). El resultado más significativo resultó ser el modelo log-aditivo (TT vs TG vs GG), donde el genotipo GG mostró un mayor riesgo de OS con un valor de OR=1,48 95%IC: 1,14-1,92; $p = 0,003$). El resto de poblaciones (española, eslovena, americana y australiana) no mostraron resultados significativos ($p > 0,05$ en todos los modelos genéticos estudiados).

Tabla 20. Estudio de asociación por frecuencias genóticas entre el polimorfismo rs2279744 del gen *MDM2* y el riesgo a desarrollar OS en los estudios incluidos en el MA.

Población	AM	Genotipo	N(%) control	N(%) casos	OR (IC 95%) cod	P cod	OR(IC 95%) rec	P rec	OR(IC 95%) dom	P dom	OR(IC 95%) log	P log	Ref	Año
España	G	TT	65 (39,6)	44 (46,8)	1	0,53	TT/GT GG 0,81 (0,40-1,67)	0,57	TT GT/GG 0,75 (0,45-1,24)	0,26	0,82 (0,57-1,18)	0,29		2015 (PE)
		GT	72 (43,9)	37 (39,4)										
		GG	27 (16,5)	13 (13,8)										
		Total	164 (100)	94 (100)										
Eslovenia	G	TT	40 (43,5)	11 (42,3)	1	0,19	TT/GT GG 0,22 (0,03-1,78)	0,09	TT GT/GG 1,05 (0,43-2,53)	0,92	0,80 (0,42-1,54)	0,50		2015 (PE)
		GT	38 (41,3)	14 (53,8)										
		GG	14 (15,2)	1 (3,9)										
		Total	92 (100)	26 (100)										
EEUU	G	TT	580 (41,0)	32 (33,7)	1	0,19	TT/GT G/G 1,56 (0,90-2,69)	0,13	TT GT/GG 1,37 (0,88-2,12)	0,16	1,32 (0,98-1,78)	0,07	(35)	2011
		GT	662 (46,8)	46 (48,4)										
		GG	174 (12,3)	17 (17,9)										
		Total	1416 (100)	95 (100)										
Australia	G	TT	21 (56,8)	7 (41,2)	1	0,52	TT/GT GG 1,11 (0,24-5,08)	0,90	TT GT/GG 1,88 (0,59-6,01)	0,29	1,35 (0,63-2,87)	0,44	(34)	2011
		GT	10 (27,0)	7 (41,2)										
		GG	6 (16,2)	3 (17,6)										
		Total	37 (100)	17 (100)										
Italia	G	TT	111 (44,4)	69 (34,3)	1	0,009*	TT/GT GG 2,02 (1,23-3,32)	0,005*	TT GT/GG 1,53 (1,04-2,24)	0,03*	1,48 (1,14-1,92)	0,003*	(33)	2009
		GT	107 (42,8)	86 (42,8)										
		GG	32 (12,8)	46 (22,9)										
		Total	250 (100)	201 (100)										

Abreviaturas: MA, alelo de menor frecuencia en controles , OR, Odds Ratio; IC, Intervalo de confianza; cod, codominante; dom, dominante; rec, recesivo; log, log-aditivo, Ref, Referencia, PE: Presente estudio;

*Valores significativos.

En el MA del modelo alélico, en todas la poblaciones, el alelo G se comportó como alelo de riesgo con valores de $OR > 1$, salvo en las poblaciones española y eslovena, donde el alelo G se comportó como alelo de protección ($OR < 1$). Con respecto al peso de cada estudio, las poblaciones italiana (28,6 %), americana (27,1 %) y española (23,1 %) fueron las que tuvieron un mayor efecto sobre el estimador global. En cuanto a la heterogeneidad de los estudios incluidos, ésta fue de un 57,1 %, siendo un estudio con heterogeneidad moderada (Figura 21).

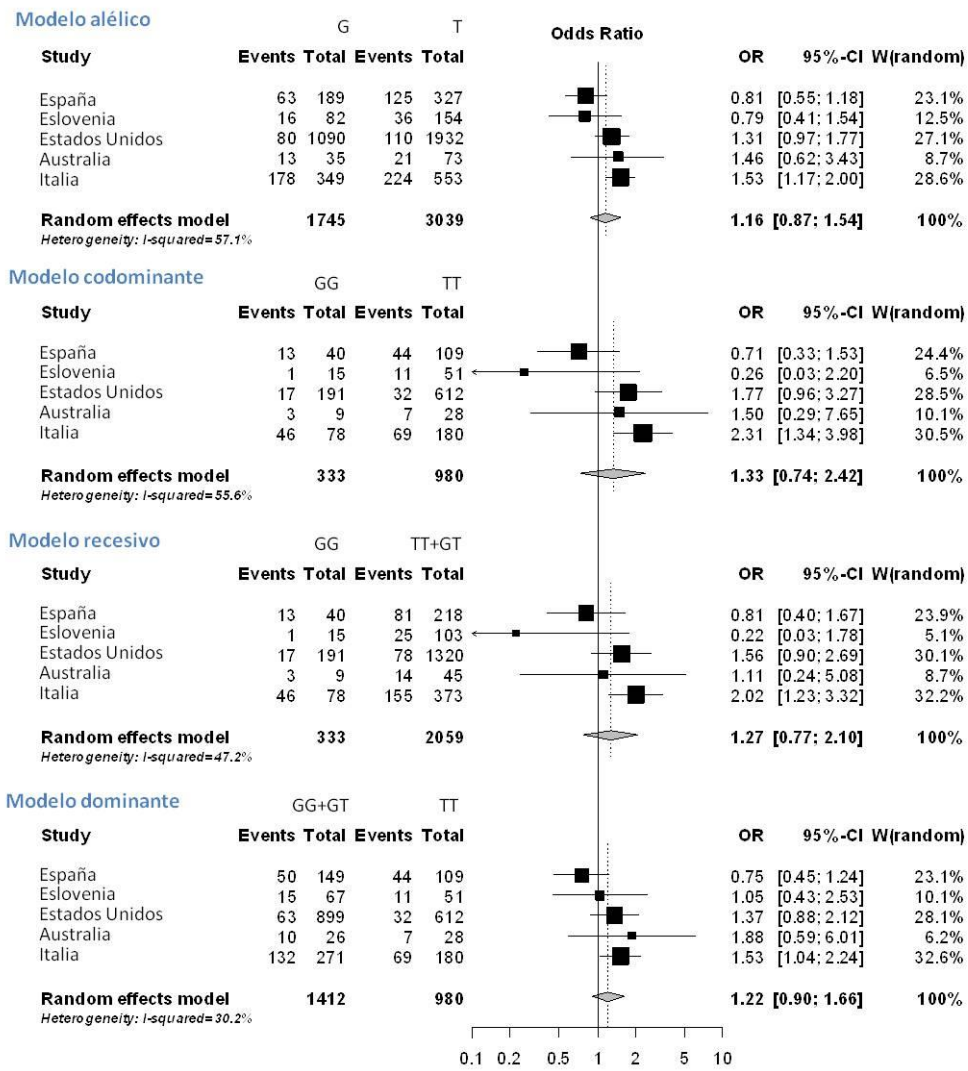


Figura 21. MA del polimorfismo rs2279744.

El resultado final del MA reveló que el polimorfismo rs2279744 no estaba asociado con el riesgo a desarrollar OS bajo ningún modelo de herencia genético (Figura 21).

1.2.3 SESGO DE PUBLICACIÓN

Con el fin de analizar el sesgo de publicación, se realizó el test de Egger, el cual consiste en medir la simetría entre estudios que muestran resultados positivos (asociación) y negativos (no asociación). El análisis del sesgo de publicación no reveló asimetría en el perfil de los *funnel plots* (Figura 22), ya que los test de Egger no fueron significativos ($p > 0,05$), (Figura anexa 1 y 2). Estos resultados indicaron que el sesgo de publicación no influyó en los resultados del presente MA.

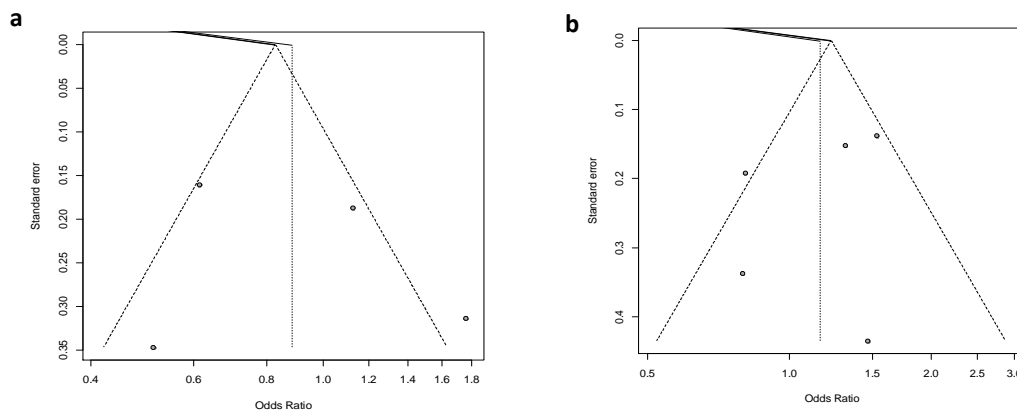


Figura 22. Funnel plots de los test de Egger para la comparación de frecuencias alélicas. a) rs1690916 para la comparación A vs G. b) rs2279744 para la comparación de los alelos G vs T.

1.3 ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO rs231775 DE *CTLA4* CON EL RIESGO A DESARROLLAR OS

Con el objetivo de determinar si el polimorfismo rs231775 del gen *CTLA4* incrementa el riesgo a desarrollar OS se realizó un estudio de asociación caso-control en la población española.

1.3.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se analizaron un total de 99 pacientes con OS y 125 controles. Las características demográficas de la población incluida se detallan en la Tabla 21.

Tabla 21. Distribución de la población de estudio en cuanto a edad y sexo en el estudio de asociación del SNP rs231775.

	Controles	Casos
Participantes (n;%)	125	99
Edad* (media, sd)	57,2 ± 12,64	13,96 ± 5,06
Sexo* (n; %)		
Masculino	68 (57,1)	60 (60,60)
Femenino	51 (42,9)	38 (38,38)

Abreviaturas: n, número de individuos; ds, desviación estándar;* Los datos de edad y sexo no estuvieron disponibles en todos los individuos (6 controles y 1 caso).

1.3.2 ÉXITO DE GENOTIPADO

El éxito de genotipado fue del 85,26% (66 pacientes y 125 controles). Las frecuencias genotípicas de la población control estuvieron en EHW ($p > 0,05$).

1.3.3 ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE EL SNP rs231775 DEL GEN *CTLA4* Y RIESGO DE OS

El estudio de asociación entre el SNP rs231775 del gen *CTLA4* y el riesgo de OS por frecuencias alélicas no mostró resultados significativos ($p > 0,05$) (Tabla 22).

Tabla 22. Estudio de asociación por frecuencias alélicas entre el polimorfismo rs231775 del gen *CTLA4* y el riesgo a desarrollar OS.

AM	MAF	Alelo	N (%) control	N (%) casos	OR (IC 95%)	P
		G	93(37,2)	40(30,3)		
G	0,38	A	157(62,8)	93(70,5)	A 1,36 (0,87-2,02)	0,21
		Total	250 (100)	132 (100)		

Abreviaturas: AM, alelo de menor frecuencia en controles; MAF, frecuencia del alelo menor; OR, Odds Ratio; IC, Intervalo de confianza.

El análisis de asociación por frecuencias genotípicas mostró resultados significativos tanto en el modelo codominante como dominante ($p > 0,05$) (Tabla 23). El resultado más significativo se obtuvo en el modelo codominante (AA vs AG y AA vs GG) con un valor de $p = 0,005$ (OR = 0,39, IC 95%: 0,21-0,74). En línea con este resultado, en el modelo dominante el genotipo AG+GG confería protección (OR = 0,45, IC95%: 0,24-0,83).

Tabla 23. Estudio de asociación por frecuencias genotípicas entre el polimorfismo rs231775 del gen *CTLA4* y el riesgo a desarrollar OS.

AM	Genotipo	N (%) control	N (%) casos	OR (IC 95%) cod	P cod	OR(IC 95%) rec	P rec	OR(IC 95%) dom	P dom	OR(IC 95%) log	P log
G	AA	37 (29,6)	32 (48,5)	1	0,005	AA/AG	0,16	AA	0,010	0,65 (0,38-1,11)	0,11
	AG	83 (66,4)	28 (42,4)	0.39 (0,21-0,74)		GG 2.40 (0,70-8,18)		AG/GG 0,45 (0,24-0,83)			
	GG	5 (4,0)	6 (9,1)	1,39 (0,39-4,98)							
	Total	125 (100)	66 (100)								

Abreviaturas: AM, alelo menor frecuencia en controles; OR, Odds Ratio; IC, Intervalo de confianza; cod, codominante; dom, dominante; rec, recesivo; log, log-aditivo.

1.4 REVISIÓN SISTEMÁTICA Y META-ANÁLISIS SOBRE LA IMPLICACIÓN DEL POLIMORFISMO rs231775 DE *CTLA4* EN EL RIESGO A DESARROLLAR OS

1.4.1 REVISIÓN SISTEMÁTICA DE LA IMPLICACIÓN DEL SNP rs231775 EN EL RIESGO A DESARROLLAR OS

En la búsqueda se identificaron un total de 378 publicaciones. Después de eliminar las duplicaciones se obtuvieron 370 publicaciones (Figura 23). Tras revisar los resúmenes de estas publicaciones se descartaron 357 porque no cumplían los criterios de inclusión (Figura 23), quedando un total de 8 artículos de los que se realizó una lectura completa. De éstos, se identificaron un total de 2 artículos que específicamente estudiaban la implicación del polimorfismo rs231775 en el riesgo de desarrollar OS.

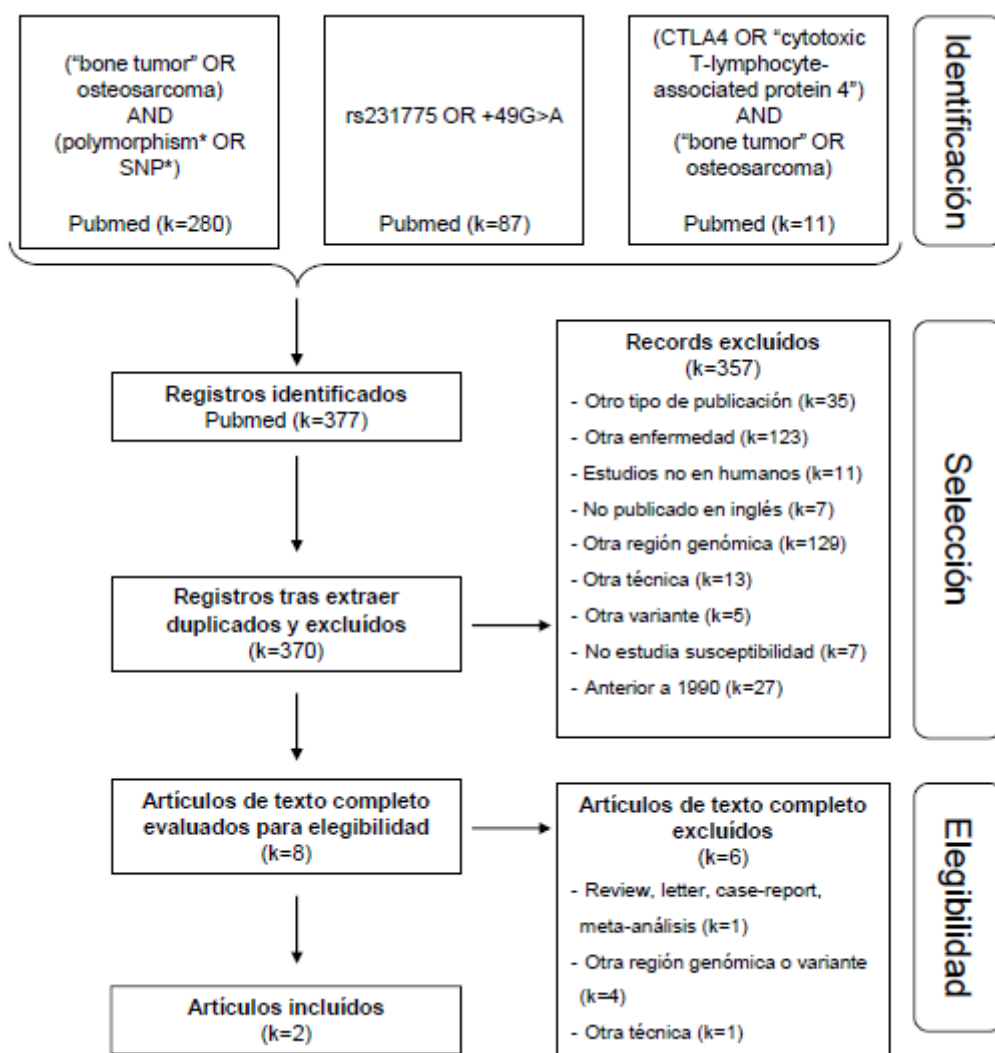


Figura 23. Diagrama de flujo de la selección de estudios.

1.4.2 META-ANÁLISIS DEL SNP rs231775

El meta-análisis del SNP rs231775 incluyó dos poblaciones chinas y la población española previamente genotipada. La distribución genotípica de los controles en cada estudio estuvieron en EHW ($p > 0,05$). Todos los estudios superaron la escala de calidad (valor > 5).

El análisis de asociación por frecuencias alélicas mostró que el SNP rs231775 estaba asociado con el riesgo a desarrollar OS en las tres poblaciones incluidas en el MA (Tabla 24).

Tabla 24. Estudio de asociación por frecuencias alélicas entre el polimorfismo rs231775 del gen *CTLA4* y el riesgo a desarrollar OS en los estudios incluidos en el MA.

Población	N _{control}	N _{casos}	AR	Fr _{control}	Fr _{casos}	OR _{AvsG} (IC 95%)	P	Ref	Año
España	123	66	A	0,63	0,37	1,36 (0,87-2,02)	0,21		2015 (PE)
China	282	267	A	0,46	0,54	1,32 (1,03-1,69)	0,03	(56)	2011
China	216	205	A	0,47	0,53	1,41 (1,07-1,87)	0,02	(57)	2011

Nota: AR, alelo riesgo; OR, Odds Ratio; IC, Intervalo de confianza; Freq., frecuencia alélica; PE; Presente estudio. *Valores significativos.

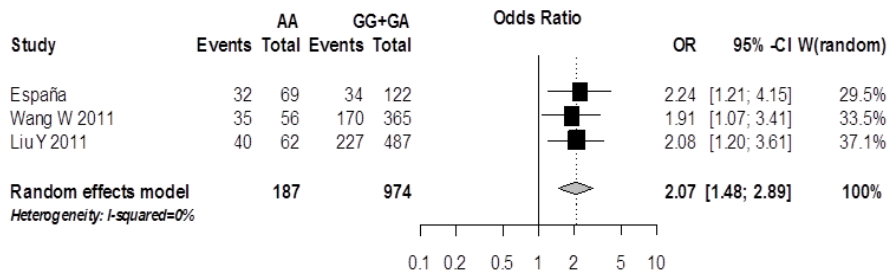
Debido a que la frecuencia del alelo menor del SNP rs231775 variaba en la población asiática con respecto a la española, realizamos el análisis por frecuencias genotípicas tomando como referencia el alelo menor de la población asiática. Es por ello que se realizaron las comparaciones AA+AG vs GG y AA vs GG+AG para las tres poblaciones en el análisis de las frecuencias genotípicas (Tabla 25). El modelo AA vs GG+AG mostró resultados significativos en las tres poblaciones siendo el genotipo AA de riesgo para la susceptibilidad del OS en todos los casos (OR= 2,24, OR: 1,91 y OR: 2,08).

Tabla 25. Estudio de asociación por frecuencias genotípicas entre el polimorfismo rs231775 del gen *CTLA4* y el riesgo a desarrollar OS en los estudios incluidos en el MA.

Población	AR	Genotipo	N(%) control	N(%) casos	OR _{AA+AGvsGG} (IC 95%)	P	OR _{AAvsGG+AG} (IC 95%)	P	Ref	Año
España	A	AA	37 (29,6)	32 (48,5)	GG AA+AG 0,42 (0,12-1,42)	0,19	GG+AG AA 2,24 (1,21-4,15)	0,01		2015 (PE)
		AG	83 (66,4)	28 (42,4)						
		GG	5 (4,0)	6 (9,1)						
		Total	125 (100)	66 (100)						
China	A	AA	22 (7,8)	40 (15,0)	GG AA+AG 1,49 (0,99-2,22)	0,05	GG+AG AA 1,91 (1,07-3,41)	0,03	(56)	2011
		AG	140 (49,6)	128 (47,9)						
		GG	120 (42,6)	99 (37,1)						
		Total	282(100)	267 (100)						
China	A	AA	21 (9,7)	35 (17,1)	GG AA+AG 1,26 (0,89-1,77)	0,19	GG+AG AA 2,08 (1,20-3,61)	0,01	(57)	2011
		AG	108 (50)	106 (51,7)						
		GG	87 (40,3)	64 (31,2)						
		Total	216 (100)	205 (100)						

En el MA por frecuencias genotípicas todos los artículos tuvieron un peso similar (aproximadamente el 30%); sin embargo, en el análisis por frecuencias alélicas el trabajo de Liu y cols, tuvo un peso del 47,8% y la población española de 14,4%. No se observó heterogeneidad entre los estudios (Figura 24).

AA vs GG+GA



A vs G

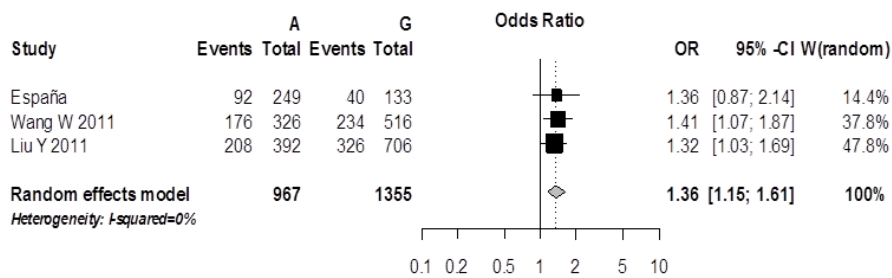


Figura 24. MA del polimorfismo rs231775.

El resultado final del MA reveló que el genotipo AA aumentaba el riesgo a desarrollar OS (OR= 2,07, IC95%: 1,48-2,89). De la misma manera, el alelo A confería riesgo a desarrollar OS (OR= 1,36, IC95%: 1,15-1,61).

2. SNPS EN GENES RELACIONADOS CON LOS MIRNAS

Con el objetivo de determinar los miRNAs implicados en la susceptibilidad al OS realizamos una búsqueda bibliográfica exhaustiva de los miRNAs desregulados en OS.

2.1 BÚSQUEDA DE MIRNAS DESREGULADOS EN LA SUSCEPTIBILIDAD DEL OSTEOSARCOMA

En la búsqueda bibliográfica se identificaron un total de 172 publicaciones sobre el tema (Figura 25). Tras revisar los resúmenes, se descartaron 85 publicaciones porque no cumplían los criterios de inclusión, quedando un total de 87 artículos de los que se realizó la lectura completa. De éstos, se descartaron 17 artículos debido a que se centraban en la búsqueda de dianas de miRNAs, o estudiaban el papel de los miRNAs en la tumorigénesis, pronóstico, metástasis, supervivencia o respuesta al tratamiento, o porque no se pudo obtener el artículo completo. Adicionalmente, se eliminaron 7 trabajos por estar centrados en líneas celulares, 33 por no especificar la edad de los pacientes y 22 por tratarse de OS de adultos, quedando un total de 8 artículos que estudiaban la desregulación de miRNAs en tejido tumoral y plasma de individuos con OS.

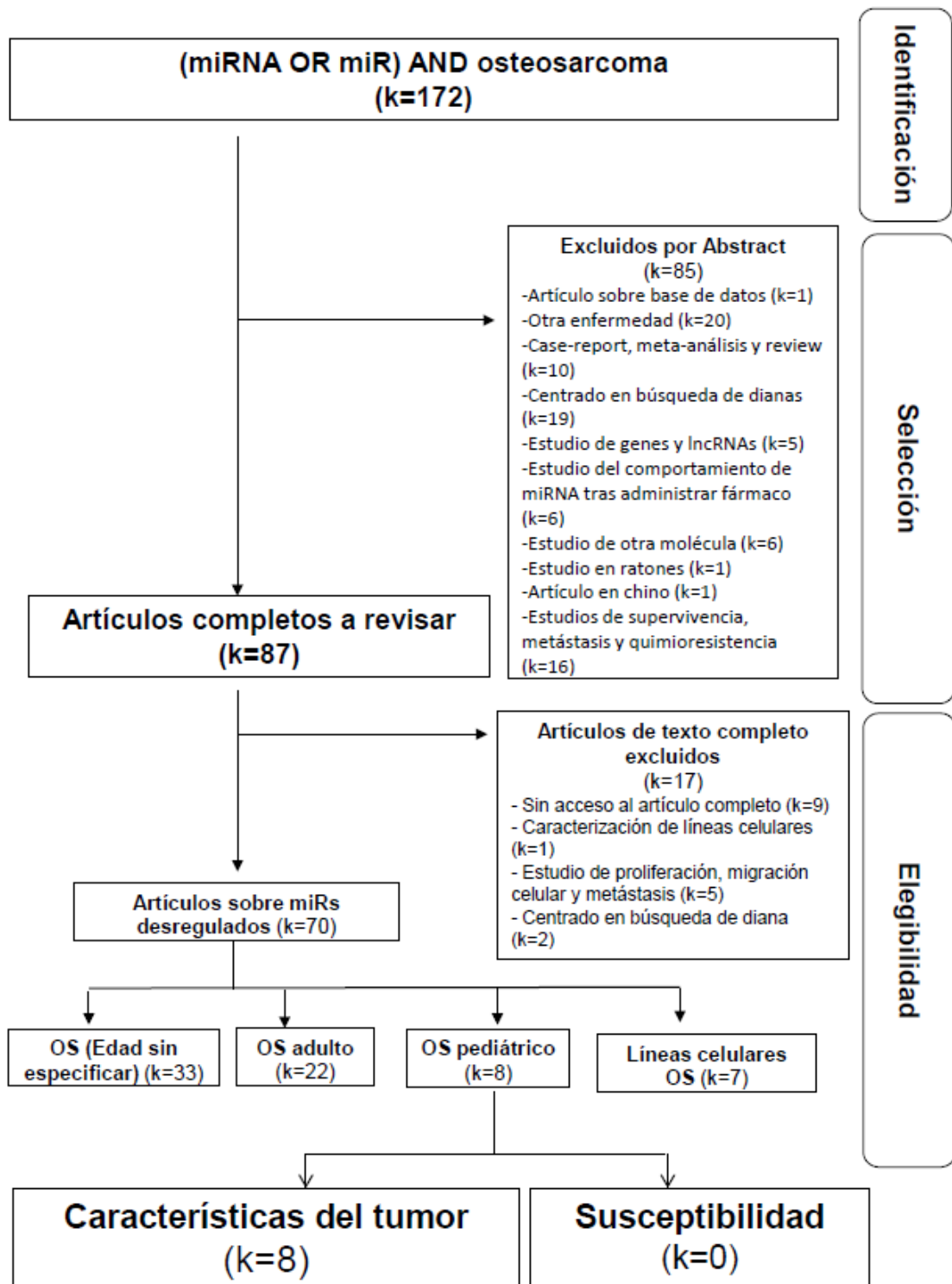


Figura 25. Diagrama de flujo de la revisión sistemática.

Debido a la falta de estudios que nos indicasen los miRNAs cuya desregulación estuviera asociada con el riesgo de OS, decidimos estudiar la variabilidad genética de todos los genes relacionados con los miRNAs, tanto de los genes de procesamiento como de los miRNAs.

2.2 SNPS EN GENES DE PROCESAMIENTO DE MIRNAS

Polimorfismos en genes de la ruta de procesamiento de miRNAs pueden afectar a su función, y como consecuencia alterar los niveles de miRNAs implicados en el desarrollo del OS. Con el objetivo de determinar si polimorfismos en estos genes estaban asociados con la susceptibilidad a desarrollar OS, realizamos un estudio caso control incluyendo 72 polimorfismos en 21 genes de procesamiento de miRNAs.

2.2.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio consistió en 99 niños y jóvenes (<34 años) diagnosticados con OS en la Unidad de Oncología del Departamento de Pediatría de la Universidad Clínica de Navarra y 387 controles de origen europeo (sin historial de cáncer previo), procedentes de la colección C.0001171 registrada en el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (Tabla 26).

Tabla 26. Distribución de la población de estudio en cuanto a edad, sexo en el estudio de asociación con genes de procesamiento de miRNAs.

	Controles	Casos
Participantes (n)	387	99
Edad* (media, sd)	51,2 ± 7,7	14,60 ± 5,23
Sexo* (n; %)		
Masculino	199 (51,4)	55 (55,6)
Femenino	187 (48,3)	44 (44,4)

Abreviaturas: Sd, desviación estándar *Nota: algunos datos de edad y sexo no estuvieron disponibles en todos los individuos.

2.2.2 ÉXITO DE GENOTIPADO

Un 87,86% de las muestras (427/486) y un 93,05% de los SNPs (67/72) fueron genotipados satisfactoriamente. Se eliminaron del estudio las muestras con más de un 20% de genotipos perdidos (n=59) y los SNPs no amplificados o con intensidad insuficiente para la separación por *clusters* (n=5). Además, 10 SNPs de los 67 SNPs genotipados no cumplieron el EHW en la población de controles y, como consecuencia, no se consideraron en posteriores análisis. En total, 15 SNPs fueron excluidos del estudio (Tabla anexa 4) dejando 57 para posteriores análisis.

2.2.3 ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN

Para estudiar si las variantes genéticas en los genes de procesamiento de miRNAs influían en el riesgo a desarrollar OS, se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas entre casos y controles de 57 polimorfismos en 21 genes. Los resultados de los análisis mostraron que tres polimorfismos en tres genes de procesamiento (*CNOT1*, *CNOT4* y *SND1*) estuvieron asociados con el riesgo a desarrollar OS ($p < 0,05$) (Tabla anexa 5).

El SNP más significativo fue rs11866002 localizado en el gen *CNOT1*. Bajo el modelo dominante, el genotipo CT+TT se asoció con una disminución del riesgo a desarrollar la enfermedad (OR= 0,44; 95% IC: 0,27-0,73; $p = 0,001$). Tras la corrección de Bonferroni, este resultado se mantuvo casi significativo ($p = 0,08$). Los SNPs rs3812265 en *CNOT4* ($p=0,025$; modelo dominante) y rs3823994 en *SND1* ($p=0,041$, modelo aditivo) también se asociaron con el riesgo a OS (antes de la corrección por Bonferroni) (Tabla 27).

Tabla 27. Resultados positivos de los análisis de asociación por frecuencias genotípicas entre SNPs en genes de procesamiento de miRNAs y riesgo de OS.

Gen	SNP	Genotipo	N(%) control	N(%) casos	OR (IC 95%) cod	P cod	OR(IC 95%) rec	P rec	OR(IC 95%) dom	P dom	OR(IC 95%) log	P log
<i>CNOT1</i>	rs11866002	CC	134 (38,7)	46 (59,0)	1,00	0,005	CC/CT 1,00 TT 0,68 0,28 1,66	0,373	CC 1,00 CT/TT 0,44 (0,27-0,73)	0,001*	0,55 (0,36-0,83)	0,003
		CT	174 (50,3)	26 (33,3)	0,44 (0,26- 0,74)							
		TT	38 (11,0)	6 (7,7)	0,46 (0,18-1,16)							
<i>CNOT4</i>	rs3812265	CC	212 (63,1)	39 (49,4)	1,00	0,059	CC/CT 1,00 TT 0,84 (0,24- 2,99)	0,790	CC 1,00 CT/TT 1,75 (1,07-2,87)	0,025	1,45 (0,97-2,18)	0,076
		CT	109 (32,4)	37 (46,8)	1,85 (1,11- 3,06)							
		TT	15 (4,5)	3 (3,8)	1,09 (0,30-3,93)							
<i>SND1</i>	rs3823994	AA	163 (46,8)	47 (59,5)	1,00	0,117	AA/AT 1,00 TT 0,61 (0,21-1,79)	0,341	AA 1,00 AT/TT 0,60 (0,37- 0,99)	0,042	0,66 (0,43-0,99)	0,041
		AT	157 (45,1)	28 (35,4)	0,62 (0,37-1,04)							
		TT	28 (8,0)	4 (5,1)	0,50 (0,17-1,48)							

*Significativo después de la corrección de Bonferroni

2.3 SNPS EN GENES DE PRE-MIRNAS

Los polimorfismos en genes de miRNAs pueden afectar a su función, y como consecuencia alterar los niveles de miRNAs implicados en el desarrollo del OS. Con el objetivo de determinar si polimorfismos en miRNAs estaban asociados con la susceptibilidad a desarrollar OS, realizamos un estudio caso control incluyendo 213 polimorfismos en 206 genes de miRNAs.

2.3.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se incluyeron un total de 100 casos de OS (<34 años): 74 casos procedentes de 3 hospitales de referencia en España y 26 de la Unidad de Oncología Pediátrica del University Children's Hospital de Liubliana, Eslovenia y sus correspondientes controles (n=160 y n=96, respectivamente). Las características demográficas de casos y controles se detallan en la tabla 28.

Tabla 28. Distribución de edad y género en la población de pacientes de OS y controles en el estudio de miRNAs.

	Total	Controles	Casos
Participantes* (n)	356	256	100
Población (n;%)			
España	234	160 (68,37)	74 (31,62)
Eslovenia	122	96 (78,68)	26 (21,31)
Edad* (media; ds)			
España	-	69,01 (17,5)	14,5 (4,7)
Eslovenia	-	46,0 (9,3)	19,5 (8,6)
Sexo* (m/h)			
España	111/120	81/79	30/41
Eslovenia	51/71	38/58	13/13

Abreviaturas: n, número de individuos; ds, desviación estándar; m, mujeres; h, hombres. *algunos datos de edad y sexo no estuvieron disponibles en todos los individuos (3 casos de la población española).

2.3.2 ÉXITO DE GENOTIPADO

De un total de 356 muestras de ADN, se genotiparon con éxito 353 (99,16%). Se eliminaron aquellas muestras con más de un 20% de genotipos perdidos.

Se seleccionaron un total de 213 SNPs en 206 pre-miRNAs. Del total de 213 SNPs incluidos inicialmente en el estudio 151 fueron genotipados satisfactoriamente (70,9%). Los SNPs fallidos se debieron a la no amplificación de la PCR, intensidad insuficiente o poca definición para la separación por *clusters*. Asimismo, 7 SNPs en la población española y 3 SNPs en la población eslovena fueron eliminados por no cumplir el EHW en la población control y, como consecuencia, no se consideraron en análisis posteriores. Los detalles sobre el éxito de genotipado se muestran en la Tabla 6 del Anexo.

2.3.3 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN EN POBLACIÓN ESPAÑOLA

Los resultados de los análisis por frecuencias genotípicas mostraron que 14 polimorfismos en 14 miRNAs estaban asociados con el riesgo a desarrollar OS ($p < 0,05$). De forma destacada, 4 SNPs estuvieron localizados en la región 14q32, 3 en el cromosoma 19, 2 en 4q24-25 y 2 en 5q. Todos los polimorfismos significativos estuvieron localizados en el pre-miRNA, salvo el SNP rs35770269 en mir-449c, que estuvo localizado en la región *seed* del miRNA. Ninguno de los SNPs se mantuvo significativo después de corregir mediante el método FDR (Tabla 29, Tabla anexa 7).

Tabla 29. Resultados positivos de los análisis de asociación por frecuencias genotípicas entre SNPs en miRNAs y riesgo de OS en población española.

miRNA	SNP	Localización	Posición	Genotipo	N(%)controles	N(%)casos	OR (IC 95%)	P	
1	mir-300	rs12894467	PM	14q32	CC	74 (46,2)	19 (27,5)	2,01 (1,32-3,06)	0,00099 (log)
					CT	71 (44,4)	34 (49,3)		
					TT	15 (9,4)	16 (23,2)		
					Totales	160 (100)	69 (100)		
2	mir-2278	rs356125	PM	9q22	GG	140 (87,5)	68 (98,6)	1	0,00224 (cod)
					AG	20 (12,5)	1 (1,4)	0,1 (0,01-0,78)	
					AA	0 (0)	0 (0)	0,00 (0,00)	
					Totales	160 (100)	69 (100)		
3	mir-576	rs77639117	PM	4q25	AA	156 (97,5)	60 (87,0)	1	0,00271 (cod)
					AT	4 (2,5)	9 (13,0)	5,85 (1,74-19,71)	
					TT	0 (0)	0 (0)	0,00 (0,00)	
					Totales	160 (100)	69 (100)		
4	mir-3188	rs7247237	PM	19p13	CC	72 (45,3)	23 (34,3)	1	0,00449 (rec)
					CT	77 (48,4)	31 (46,3)	3,59 (1,49-8,66)	
					TT	10 (6,3)	13 (19,4)		
					Totales	159 (100)	67 (100)		
5	mir-492	rs2289030	PM	12q22	CC	130 (81,2)	60 (87,0)	1	0,02652 (rec)
					CG	30 (18,8)	6 (8,7)		
					GG	0 (0,0)	3 (4,3)		
					Totales	160 (100)	69 (100)		
6	mir-2053	rs10505168	PM	8q23,3	AA	78 (49,1)	25 (36,2)	1	0,00869 (cod)
					AG	65 (40,9)	42 (60,9)	2,02 (1,11-3,65)	
					GG	16 (10,1)	2 (2,9)	0,39 (0,08-1,81)	
					Totales	159 (100)	69 (100)		
7	mir-4467	rs60871950	M	7q22,1	GG	35 (22,0)	27 (39,1)	1	0,00880 (dom)
					AG	83 (52,2)	23 (33,3)	0,44 (0,24-0,81)	
					AA	41 (25,8)	19 (27,5)		
					Totales	159 (100)	69 (100)		
8	mir-412	rs61992671	M/PM	14q32	GG	57 (35,6)	13 (20,0)	1	0,0185 (dom)
					AG	66 (41,2)	35 (53,8)	2,21 (1,11-4,41)	
					AA	37 (23,1)	17 (26,2)		
					Totales	160 (100)	65 (100)		
9	mir-5196	rs10406069	PM	19q13	GG	110 (69,6)	43 (62,3)	1	0,0207 (codom)
					AG	39 (24,7)	26 (37,7)	1,71 (0,93-3,13)	
					AA	9 (5,7)	0 (0,0)	0,00 (0,00)	
					Totales	158 (100)	69 (100)		
10	mir-656	rs58834075	PM	14q32	CC	157 (98,1)	63 (91,3)	1	0,02102 (codom)
					CT	3 (1,9)	6 (8,7)	4,98 (1,21-20,55)	
					TT	0 (0)	0 (0)		
					Totales	160 (100)	69 (100)		
11	mir-4309	rs12879262	PM	14q32	GG	111 (69,8)	39 (56,5)	1	0,0223 (codom)
					CG	43 (27,0)	30 (43,5)	1,99 (1,10-3,59)	
					CC	5 (3,1)	0 (0,0)	0,00 (0,00)	
					Totales	159 (100)	69 (100)		
12	mir-378h	rs702742	PM	5q33	AA	117 (73,1)	58 (86,6)	1	0,0224 (dom)
					AG	41 (25,6)	8 (11,9)	0,42 (0,19-0,93)	
					GG	2 (1,2)	1 (1,5)		
					Totales	160 (100)	67 (100)		
13	mir-4745	rs10422347	M/PM	19p13	CC	138 (87,3)	51 (75,0)	1	0,0255 (dom)
					CT	19 (12,0)	17 (25,0)	2,30 (1,12-4,73)	
					TT	1 (0,6)	0 (0,0)		
					Totales	158 (100)	68 (100)		
14	mir-449c	rs35770269	PM/seed	5q11	AA	61 (38,4)	35 (50,7)	0,64 (0,42-0,98)	0,0382 (log)
					AT	71 (44,7)	28 (40,6)		
					TT	27 (17,0)	6 (8,7)		
					Totales	159 (100)	69 (100)		

Abreviaturas: Pajust, Valores de p ajustados por sexo; NS: No significativo; PM, pre-maduro; M, maduro; dom, dominante; rec, recesivo; codom, codominante, log, log-aditivo

Por otro lado, el análisis por frecuencias alélicas mostró 10 polimorfismos en 10 genes de miRNAs asociados con el riesgo a OS (Tabla 30). Comparando estos resultados con los obtenidos en los análisis por frecuencias genotípicas, se encontraron tres nuevos SNPs en 3 miRNAs (mir-4752, mir-4268 y mir-1283-2) asociados con el riesgo a OS. Es interesante remarcar que el SNP en el mir-449c está localizado en el *seed* del miRNA.

Tabla 30. Resultados positivos de los análisis de asociación por frecuencias alélicas entre SNPs en miRNAs y riesgo de OS en población española.

Gen	SNP	Localización	Posición	Alelo	Frec. controles	Frec. casos	OR (IC 95%)	P	
1	mir-300	rs12894467	PM	14q32	T	0,316	0,493	2,11 (1,42-3,15)	0,0002
2	mir-576	rs77639117	PM	4q25	T	0,012	0,061	5,16 (1,55-16,89)	0,0031
3	mir-3188	rs7247237	PM	19p13	T	0,305	0,438	1,77 (1,18-2,67)	0,0056
4	mir-2278	rs356125	PM	9q22	G	0,938	0,993	9,8 (1,30-73,73)	0,0068
5	mir-656	rs58834075	PM	14q32	T	0,009	0,047	5,24 (1,34-20,58)	0,0083
6	mir-4752	rs4112253	PM	19q13	C	0,619	0,730	1,66 (1,09-2,55)	0,0189
7	mir-4745	rs10422347	M/PM	19p13	T	0,066	0,130	2,10 (1,09-4,04)	0,0236
8	mir-4268	rs4674470	PM	2q35	T	0,865	0,783	1,77 (1,03-3,05)	0,0364
9	mir-1283-2	rs71363366	PM	19q13	G	0,019	0,054	2,99 (1,02-8,78)	0,0371
10	mir-449c	rs35770269	PM/seed	5q11	A	0,607	0,703	1,53 (1,01-2,33)	0,0453

Abreviaturas: PM, pre-maduro; M, maduro.

2.3.4 ANÁLISIS *IN SILICO* EN POBLACIÓN ESPAÑOLA

Para comprobar el cambio de estructura secundaria debida a los mir-SNPs comparamos el cambio de energía liberada en la estructura secundaria de los miRNAs con SNPs significativos. En la población española, los SNPs en rs2289030 en mir-492, rs35770269 en mir-449c, rs10422347 en mir-4745, rs60871950 en mir-4467 y rs10406069 en mir-5196 provocaron cambios en la estructura secundaria de los miRNAs (Figura 27).

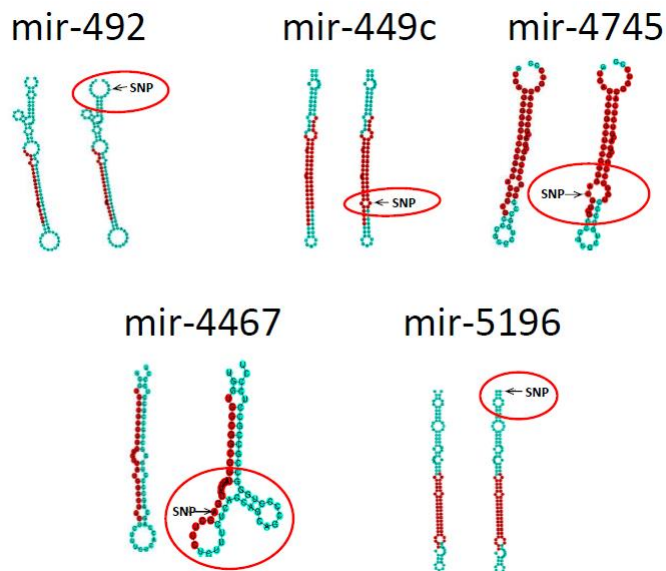


Figura 27. Estructura secundaria de los miRNAs con SNPs asociados al riesgo a desarrollar OS en la población española que cambiaban su estructura secundaria, predicho por la base de datos miRNASNP.

2.3.5 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN EN POBLACIÓN ESLOVENA

El análisis por frecuencias genotípicas en la población eslovena mostró que 9 polimorfismos en 8 miRNAs estaban asociados con el riesgo a desarrollar OS ($p < 0,05$). De forma destacada, 3 polimorfismos estuvieron localizados en la región *seed* de sus respectivos miRNAs (mir-3620, mir-4707 y mir-499a), 2 estuvieron situados en el mir-5189 (rs35613341 y rs56292801) y otros 2 SNPs se localizaron en la región 2p16 (rs6726779 y rs243080). La asociación del SNP rs35613341 se mantuvo significativa después de la corrección por Bonferroni (Tabla 31, Tabla anexa 8).

Tabla 31. Resultados positivos de los análisis de asociación por frecuencias genotípicas entre SNPs en miRNAs y riesgo de OS en población eslovena.

Gen	SNP	Localización	Posición	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (IC 95%)	P	
1	mir-5189	rs35613341	PM	16q24	CC	49 (51,0)	16 (69,6)	1 0,07 (0,01-0,59) 3,06 (0,86-10,85)	0,00011* (codom)
					CG	41 (42,7)	1 (4,3)		
					GG	6 (6,2)	6 (26,1)		
					Totales	96 (100)	23(100)		
2	mir-4268	rs4674470	PM	2q35	TT	50 (52,1)	17 (85,0)	1 0,07 (0,01-0,58) 0,98 (0,18-5,33)	0,00208 (codom)
					CT	40 (41,7)	1 (5,0)		
					CC	6 (6,2)	2 (10,0)		
					Totales	96 (100)	20 (100)		
3	mir-3620	rs2070960	PM/seed	1q42	CC	75 (78,9)	21 (87,5)	1 0,18 (0,02-1,41) 0,00	0,00783 (codom)
					CT	20 (21,1)	1 (4,2)		
					TT	0 (0,0)	2 (8,3)		
					Totales	95 (100)	24 (100)		
4	mir-5189	rs56292801	PM	16q24	GG	51 (53,1)	18 (81,8)	1 0,25 (0,08-0,80)	0,01017 (dom)
					AG	41 (42,7)	3 (13,6)		
					AA	4 (4,2)	1 (4,5)		
					Totales	96 (100)	22 (100)		
5	mir-4707	rs2273626	PM/seed	14q11	AA	31 (32,3)	2 (8,7)	1 5,01 (1,10-22,72)	0,0132 (dom)
					AC	45 (46,9)	15 (65,2)		
					CC	20 (20,8)	6 (26,1)		
					Totales	96 (100)	23(100)		
6	mir-4431	rs6726779	PM	2p16	TT	34 (35,8)	12 (63,2)	1 0,22 (0,07-0,75) 0,85 (0,20-3,62)	0,0272 (codom)
					CT	51 (53,7)	4 (21,1)		
					CC	10 (10,5)	3 (15,8)		
					Totales	95 (100)	19 (100)		
7	mir-5682	rs9877402	PM	8q22	AA	88 (93,6)	17 (85,0)	1 0,00	0,0296 (rec)
					AG	6 (6,4)	1 (5,0)		
					GG	0 (0,0)	2 (10,0)		
					Totales	94 (100)	20 (100)		
8	mir-4432	rs243080	PM	2p16	CC	30 (31,6)	12 (57,1)	1 0,35 (0,13-0,91)	0,0303 (dom)
					CT	49 (51,6)	5 (23,8)		
					TT	16 (16,8)	4 (19,0)		
					Totales	95 (100)	21 (100)		
9	mir-499a	rs3746444	PM/seed	20q11	TT	64 (66,7)	18 (75,0)	1 6,71 (1,06-42,73)	0,0444 (rec)
					CT	30 (31,2)	3 (12,5)		
					CC	2 (2,1)	3 (12,5)		
					Totales	96 (100)	24 (100)		

Abreviaturas:* Significativo después de la corrección por Bonferroni. PM, pre-maduro; M, maduro; dom, dominante; rec, recesivo; codom, codominante, log, log-aditivo

En el análisis por frecuencias alélicas, 3 polimorfismos en 3 miRNAs estuvieron asociados con el riesgo a OS (Tabla 32). Entre los resultados interesantes encontramos que el SNP rs2273626 en mir-4707 está localizado en el *seed* del miRNA. Comparando estos

resultados con los obtenidos en los análisis por frecuencias genotípicas, se encontró 1 nuevo SNP en mir-5197 asociado al riesgo a OS.

Tabla 32. Resultados positivos de los análisis de asociación por frecuencias alélicas entre SNPs en miRNAs y riesgo de OS en población eslovena.

Gen	SNP	Localización	Posición	Alelo	N control	N casos	OR (IC 95%)	P	
2	mir-4707	rs2273626	PM/seed	14q11	C	0,443	0,667	2,52 (1,12-5,66)	0,0223
3	mir-5197	rs2042253	PM	5q31	A	0,753	0,933	4,60 (1,06-20,05)	0,0271
5	mir-5189	rs56292801	PM	16q24	G	0,745	0,929	4,45 (1,02-19,46)	0,0313

Abreviaturas: PM, pre-maduro; M, maduro.

2.3.6 ANÁLISIS *IN SILICO* EN POBLACIÓN ESLOVENA

En la población eslovena, los SNPs en rs56292801 y rs35613342 en mir-5189 y rs2273626 en mir-4707 provocaron cambios en la estructura secundaria de los miRNAs (Figura 28).

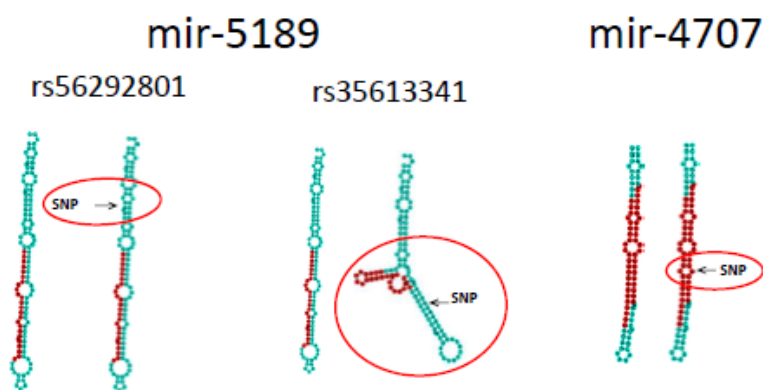


Figura 28. Estructura secundaria de los miRNAs con SNPs asociados al riesgo a desarrollar OS en la población eslovena que cambiaban su estructura secundaria, predicho por la base de datos miRNASNP.

2.3.7 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN EN POBLACIÓN ESPAÑOLA Y ESLOVENA

Cuando analizamos las poblaciones española y eslovena juntas, encontramos 12 SNPs en 12 miRNAs asociados con la susceptibilidad a desarrollar OS. Cuando comparamos estos

resultados con los obtenidos en cada población de forma individual, observamos que 9 de los 12 SNPs ya habían mostrado resultados significativos en alguna de las dos poblaciones por separado. Ninguno de los SNPs se mantuvo significativo después de corregir por FDR (Tabla 32, Tabla anexa 9).

Tabla 32. Resultados positivos de los análisis de asociación por frecuencias genotípicas entre SNPs en miRNAs y riesgo de OS en la población total.

	miRNA	SNP	Genotipo	Población conjunta			Población española			Población eslovena		
				Controles	Casos	P	Controles	Casos	P	Controles	Casos	P
1	mir-576	rs77639117	AA	249 (97,3)	81 (88,0)	0,002	156 (97,5)	60 (87,0)	0,003	93 (96,9)	21 (91,3)	0,1
			AT	7 (2,7)	10 (10,9)		4 (2,5)	9 (13,0)		3 (3,1)	1 (4,3)	
			TT	0 (0,0)	1 (1,1)		0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	1 (4,3)	
			Totales	256 (100)	92 (100)		160 (100)	69 (100)		96 (100)	24 (100)	
2	mir-5682	rs9877402	AA	233 (92,5)	32 (84,2)	0,002	145 (91,8)	15 (83,3)	0,07	88 (93,6)	17 (85,0)	0,03
			AG	19 (7,5)	3 (7,9)		13 (8,2)	2 (11,1)		6 (6,4)	1 (5,0)	
			GG	0 (0,0)	3 (7,9)		0 (0,0)	1 (5,6)		0 (0,0)	2 (10,0)	
			Totales	252 (100)	38 (100)		158 (100)	18 (100)		94 (100)	20 (100)	
3	mir-4707	rs2273626	CC	45 (25,4)	30 (33,3)	0,004	25 (30,9)	24 (35,8)	0,1	20 (20,8)	6 (26,1)	0,01
			AC	79 (44,6)	47 (52,2)		34 (42,0)	32 (47,8)		45 (46,9)	15 (65,2)	
			AA	53 (29,9)	13 (14,4)		22 (27,2)	11 (16,4)		31 (32,3)	2 (8,7)	
			Totales	177 (100)	90 (100)		81 (100)	67 (100)		96 (100)	23 (100)	
4	mir-4268	rs4674470	TT	151 (59,2)	67 (75,3)	0,006	101 (63,5)	50 (72,5)	0,06	50 (52,1)	17 (85,0)	0,002
			CT	87 (34,1)	19 (21,3)		47 (29,6)	18 (26,1)		40 (41,7)	1 (5,0)	
			CC	17 (6,7)	3 (3,4)		11 (6,9)	1 (1,4)		6 (6,2)	2 (10,0)	
			Totales	255 (100)	89 (100)		159 (100)	69 (100)		96 (100)	20 (100)	
5	mir-300	rs12894467	CC	99 (38,7)	26 (28,0)	0,01	74 (46,2)	19 (27,5)	0,001	25 (26,0)	7 (29,2)	0,5
			CT	124 (48,4)	45 (48,4)		71 (44,4)	34 (49,3)		53 (55,2)	11 (45,8)	
			TT	33 (12,9)	22 (23,7)		15 (9,4)	16 (23,2)		18 (18,8)	6 (25,0)	
			Totales	256 (100)	93 (100)		160 (100)	69 (100)		96 (100)	24 (100)	
6	mir-4745	rs10422347	CC	218 (85,8)	68 (74,7)	0,02	138 (87,3)	51 (75,0)	0,03	80 (83,3)	17 (73,9)	0,3
			CT	34 (13,4)	23 (25,3)		19 (12,0)	17 (25,0)		15 (15,6)	6 (26,1)	
			TT	2 (0,8)	0 (0,09)		1 (0,6)	0 (0,0)		1 (1,0)	0 (0,0)	
			Totales	254 (100)	91 (100)		158 (100)	68 (100)		96 (100)	23 (100)	
10	mir-3620	rs2070960	CC	216 (85,0)	74 (82,2)	0,02	141 (88,7)	53 (80,3)	0,09	75 (78,9)	21 (87,5)	0,008
			CT	38 (15,0)	13 (14,4)		18 (11,3)	12 (18,2)		20 (21,1)	1 (4,2)	
			TT	0 (0,0)	3 (3,3)		0 (0,0)	1 (1,5)		0 (0,0)	2 (8,3)	
			Totales	254 (100)	90 (100)		159 (100)	66 (100)		95 (100)	24 (100)	
7	mir-1255a	rs28664200	TT	137 (54,6)	13 (39,4)	0,03	86 (55,5)	2 (15,4)	0,001	51 (53,1)	11 (55,0)	0,4
			CT	102 (40,6)	15 (45,5)		62 (40,0)	8 (61,5)		40 (41,7)	7 (35,0)	
			CC	12 (4,8)	5 (15,2)		7 (4,5)	3 (23,1)		5 (5,2)	2 (10,0)	
			Totales	251 (100)	33 (100)		155 (100)	13 (100)		96 (100)	20 (100)	
8	mir-3188	rs7247237	CC	115 (45,3)	37 (40,2)	0,03	72 (45,3)	23 (34,3)	0,004	43 (45,3)	14 (56,0)	0,3
			CT	121 (47,6)	41 (44,6)		77 (48,4)	31 (46,3)		44 (46,3)	10 (40,0)	
			TT	18 (7,1)	14 (15,2)		10 (6,3)	13 (19,4)		8 (8,4)	1 (4,0)	
			Totales	254 (100)	92 (100)		159 (100)	67 (100)		95 (100)	25 (100)	
9	mir-146a	rs2910164	GG	144 (56,2)	64 (68,8)	0,03	84 (52,5)	46 (66,7)	0,05*	60 (62,5)	18 (75,0)	0,2
			CG	96 (37,5)	23 (24,7)		66 (41,2)	18 (26,1)		30 (31,2)	5 (20,8)	
			CC	16 (6,2)	6 (6,5)		10 (6,2)	5 (7,2)		6 (6,2)	1 (4,2)	
			Totales	256 (100)	93 (100)		160 (100)	69 (100)		96 (100)	24 (100)	
11	mir-4752	rs4112253	CC	103 (40,2)	46 (52,3)	0,03	60 (37,5)	34 (49,3)	0,05	43 (44,8)	12 (63,2)	0,1
			CG	119 (46,5)	35 (39,8)		78 (48,8)	30 (43,5)		41 (42,7)	5 (26,3)	
			GG	34 (13,3)	7 (8,0)		22 (13,8)	5 (7,2)		12 (12,5)	2 (10,5)	
			Totales	256 (100)	88 (100)		160 (100)	69 (100)		96 (100)	19 (100)	
12	mir-6128	rs67042258	GG	143 (56,1)	59 (65,6)	0,04	89 (56)	47 (69,1)	0,06	54 (56,2)	12 (54,5)	0,1
			AG	97 (38,0)	22 (24,4)		62 (39)	16 (23,5)		35 (36,5)	6 (27,3)	
			AA	15 (5,9)	9 (10,0)		8 (5)	5 (7,4)		7 (7,3)	4 (18,2)	
			Totales	255 (100)	90 (100)		159 (100)	68 (100)		96 (100)	22 (100)	

Juntando todos los resultados significativos obtenidos en los diferentes análisis realizados (por frecuencias genotípicas), se obtuvieron un total de 26 SNPs significativos en 25 miRNAs: 14 SNPs fueron significativos sólo en la población española, 9 SNPs sólo en la población eslovena y 3 SNPs fueron significativos únicamente cuando se juntaron las dos

poblaciones (mir-146a, mir-4752 y mir-6128). En estos últimos, a pesar de que los SNPs no son significativos en cada población por separado, sí se observa la misma tendencia de riesgo en ambas poblaciones (Tabla 33).

Tabla 33. Resumen de resultados de asociación de las poblaciones española y eslovena en comparación con la población conjunta (continúa).

miRNA	SNP	Genotipo	Población conjunta			Población española			Población eslovena			
			Controles (N=256)	Casos (N=100)	P _{Totales}	Controles (N=160)	Casos (N=74)	P _{España}	Controles (N=96)	Casos (N=26)	P _{Eslovenia}	
1	mir-300	rs12894467 (PM)	CC	99 (38,7)	26 (28,0)	0,0103 TT 1,57(1,11-2,22)(log)	74 (46,2)	19 (27,5)	0,0010 TT 2,01 (1,32-3,06)(log)	25 (26,0)	7 (29,2)	0,5025
			CT	124 (48,4)	45 (48,4)		71 (44,4)	34 (49,3)		53 (55,2)	11 (45,8)	
			TT	33 (12,9)	22 (23,7)		15 (9,4)	16 (23,2)		18 (18,8)	6 (25,0)	
			Todas	256 (100)	93 (100)		160 (100)	69 (100)		96 (100)	24 (100)	
2	mir-2278	rs356125 (PM)	GG	225 (87,9)	90 (94,7)	0,0460 AG/AA 0,40 (0,15-1,07)(dom)	140 (87,5)	68 (98,6)	0,0022 AG 0,1 (0,01-0,78)(cod)	85 (88,5)	22 (84,6)	0,6043
			AG	30 (11,7)	5 (5,3)		20 (12,5)	1 (1,4)		10 (10,4)	4 (15,4)	
			AA	1 (0,4)	0 (0,0)		0 (0,0)	0 (0,0)		1 (1,0)	0 (0,0)	
			Todas	256 (100)	95 (100)		160 (100)	69 (100)		96 (100)	26 (100)	
3	mir-576	rs77639117 (PM)	AA	249 (97,3)	81 (88,0)	0,0015 AT/TT 4,83 (1,81-12,87)(rec)	156 (97,5)	60 (87,0)	0,0027 AT 5,85 (1,74-19,71)(cod)	93 (96,9)	21 (91,3)	0,1282
			AT	7 (2,7)	10 (10,9)		4 (2,5)	9 (13,0)		3 (3,1)	1 (4,3)	
			TT	0 (0,0)	1 (1,1)		0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	1 (4,3)	
			Todas	256 (100)	92 (100)		160 (100)	69 (100)		96 (100)	23 (100)	
4	mir-3188	rs7247237 (PM)	CC	115 (45,3)	37 (40,2)	0,0275 TT 2,35 (1,12-4,95)(rec)	72 (45,3)	23 (34,3)	0,0045 TT 3,59 (1,49-8,66)(rec)	43 (45,3)	14 (56,0)	0,2726
			CT	121 (47,6)	41 (44,6)		77 (48,4)	31 (46,3)		44 (46,3)	10 (40,0)	
			TT	18 (7,1)	14 (15,2)		10 (6,3)	13 (19,4)		8 (8,4)	1 (4,0)	
			Todas	254 (100)	92 (100)		159 (100)	67 (100)		95 (100)	25 (100)	
5	mir-492	rs2289030 (PM)	CC	211 (82,4)	79 (85,9)	0,0415 GG 8,60 (0,88-83,70)(rec)	130 (81,2)	60 (87,0)	0,0265 GG 0 (rec)	81 (84,4)	19 (82,6)	0,7989
			CG	44 (17,2)	10 (10,9)		30 (18,8)	6 (8,7)		14 (14,6)	4 (17,4)	
			GG	1 (0,4)	3 (3,3)		0 (0,0)	3 (4,3)		1 (1,0)	0 (0,0)	
			Todas	256 (100)	92 (100)		160 (100)	69 (100)		96 (100)	23 (100)	
6	mir-2053	rs10505168 (PM)	AA	123 (48,2)	36 (40,4)	0,1128	78 (49,1)	25 (36,2)	0,0087 AG 2,02 (1,11-3,65) GG 0 (cod)	45 (46,9)	11 (55,0)	0,4723
			AG	107 (42,0)	48 (53,9)		65 (40,9)	42 (60,9)		42 (43,8)	6 (30,0)	
			GG	25 (9,8)	5 (5,6)		16 (10,1)	2 (2,9)		9 (9,4)	3 (15,0)	
			Todas	255 (100)	89 (100)		159 (100)	69 (100)		96 (100)	20 (100)	
7	mir-4467	rs60871950 (M)	GG	78 (30,6)	36 (39,1)	0,1043	35 (22,0)	27 (39,1)	0,0088 AG/AA 0,44 (0,24-0,81) (dom)	43 (44,8)	9 (39,1)	0,4899
			AG	121 (47,5)	32 (34,8)		83 (52,2)	23 (33,3)		38 (39,6)	9 (39,1)	
			AA	56 (22,0)	24 (26,1)		41 (25,8)	19 (27,5)		15 (15,6)	5 (21,7)	
			Todas	255 (100)	92 (100)		159 (100)	69 (100)		96 (100)	23 (100)	
8	mir-412	rs61992671 (M/PM)	GG	76 (29,7)	18 (20,7)	0,0973	57 (35,6)	13 (20,0)	0,0185 AG/AA 2,21 (1,11-4,41)(dom)	19 (19,8)	5 (22,7)	0,7419
			AG	119 (46,5)	47 (54,0)		66 (41,2)	35 (53,8)		53 (55,2)	12 (54,5)	
			AA	61 (23,8)	22 (25,3)		37 (23,1)	17 (26,2)		24 (25,0)	5 (22,7)	
			Todas	256 (100)	87 (100)		160 (100)	65 (100)		96 (100)	22 (100)	
9	mir-5196	rs10406069 (PM)	GG	171 (67,3)	57 (62,6)	0,1075	110 (69,6)	43 (62,3)	0,0207 AG 1,71 (0,93-3,13) AA 0 (cod)	61 (63,5)	14 (63,6)	0,5394
			AG	72 (28,3)	33 (36,3)		39 (24,7)	26 (37,7)		33 (34,4)	7 (31,8)	
			AA	11 (4,3)	1 (1,1)		9 (5,7)	0 (0,0)		2 (2,1)	1 (4,5)	
			Todas	254 (100)	91 (100)		158 (100)	69 (100)		96 (100)	22 (100)	
10	mir-656	rs58834075 (PM)	CC	245 (95,7)	89 (93,7)	0,4457	157 (98,1)	63 (91,3)	0,02102 CT 4,98 (1,21-20,55) TT 0 (cod)	88 (91,7)	26 (100,0)	0,2002
			CT	11 (4,3)	6 (6,3)		3 (1,9)	6 (8,7)		8 (8,3)	0 (0,0)	
			TT	0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	0 (0,0)	
			Todas	256 (100)	95 (100)		160 (100)	69 (100)		96 (100)	26 (100)	
11	mir-4309	rs12879262 (PM)	GG	188 (73,7)	55 (60,4)	0,0098 CG 2,02 (1,21-3,36) CC 0 (cod)	111 (69,8)	39 (56,5)	0,0223 CG 1,99 (1,10-3,59) CC 0 (cod)	77 (80,2)	16 (72,7)	0,4494
			CG	61 (23,9)	36 (39,6)		43 (27,0)	30 (43,5)		18 (18,8)	6 (27,3)	
			CC	6 (2,4)	0 (0,0)		5 (3,1)	0 (0,0)		1 (1,0)	0 (0,0)	
			Todas	255 (100)	91 (100)		159 (100)	69 (100)		96 (100)	22 (100)	
12	mir-378h	rs702742 (PM)	AA	204 (79,7)	77 (84,6)	0,2951	117 (73,1)	58 (86,6)	0,0224 AG/GG 0,42 (0,19-0,93)(dom)	87 (90,6)	19 (79,2)	0,1421
			AG	49 (19,1)	13 (14,3)		41 (25,6)	8 (11,9)		8 (8,3)	5 (20,8)	
			GG	3 (1,2)	1 (1,1)		2 (1,2)	1 (1,5)		1 (1,0)	0 (0,0)	
			Todas	256 (100)	91 (100)		160 (100)	67 (100)		96 (100)	24 (100)	
13	mir-4745	rs10422347 (M/PM)	CC	218 (85,8)	68 (74,7)	0,0194 CT/TT 2,05 (1,14-3,69)(dom)	138 (87,3)	51 (75,0)	0,0255 CT/TT 2,30 (1,12-4,73)(dom)	80 (83,3)	17 (73,9)	0,3122
			CT	34 (13,4)	23 (25,3)		19 (12,0)	17 (25,0)		15 (15,6)	6 (26,1)	
			TT	2 (0,8)	0 (0,0)		1 (0,6)	0 (0,0)		1 (1,0)	0 (0,0)	
			Todas	254 (100)	91 (100)		158 (100)	68 (100)		96 (100)	23 (100)	
14	mir-449c	rs35770269 (PM/seed)	AA	103 (40,4)	42 (46,7)	0,3387	61 (38,4)	35 (50,7)	0,0382 TT 0,64 (0,42-0,98)(log)	42 (43,8)	7 (33,3)	0,3761
			AT	116 (45,5)	40 (44,4)		71 (44,7)	28 (40,6)		45 (46,9)	12 (57,1)	
			TT	36 (14,1)	8 (8,9)		27 (17,0)	6 (8,7)		9 (9,4)	2 (9,5)	
			Todas	255 (100)	90 (100)		159 (100)	69 (100)		96 (100)	21 (100)	

Abreviaturas: PM, pre-maduro; M, maduro, dom, dominante; rec, recesivo; codom, codominante, log, log-aditivo

Tabla 33. Resumen de resultados de asociación de las poblaciones española y eslovena en comparación con la población conjunta.

miRNA	SNP	Genotipo	Población conjunta			Población española			Población eslovena			P _{totales}
			Controles (N=160)	Casos (N=74)	P _{España}	Controles (N=96)	Casos (N=26)	P _{Eslovenia}	Controles (N=256)	Casos (N=100)		
15	mir-5189 rs35613341 (PM)	CC	72 (45,0)	38 (56,7)	0,1069	49 (51,0)	16 (69,6)	0,0001* CG 0,07 (0,01-0,59) GG 3,06(0,86-0,85)(cod)	121 (47,3)	54 (60)	0,0048 CG 0,41 (0,23-0,75) GG 1,09 (0,57-2,08)(cod)	
		CG	57 (35,6)	17 (25,4)		41 (42,7)	1 (4,3)		98 (38,3)	18 (20)		
		GG	31 (19,4)	12 (17,9)		6 (6,2)	6 (26,1)		37 (14,5)	18 (20)		
		Todas	160 (100)	67 (100)		96 (100)	23 (100)		256 (100)	90 (100)		
16	mir-4268 rs4674470 (PM)	TT	101 (63,5)	50 (72,5)	0,0582	50 (52,1)	17 (85,0)	0,0021 CT 0,07 (0,01-0,58) CC 0,98 (0,18-5,33)(cod)	151 (59,2)	67 (75,3)	0,0057 CT/CC 0,48 (0,28-0,82)(dom)	
		CT	47 (29,6)	18 (26,1)		40 (41,7)	1 (5,0)		87 (34,1)	19 (21,3)		
		CC	11 (6,9)	1 (1,4)		6 (6,2)	2 (10,0)		17 (6,7)	3 (3,4)		
		Todas	159 (100)	69 (100)		96 (100)	20 (100)		255 (100)	89 (100)		
17	mir-3620 rs2070960 (PM/seed)	CC	141 (88,7)	53 (80,3)	0,0929	75 (78,9)	21 (87,5)	0,0078 CT 0,18 (0,02-1,41) TT 0 (cod)	216 (85,0)	74 (82,2)	0,0175 TT 0 (rec)	
		CT	18 (11,3)	12 (18,2)		20 (21,1)	1 (4,2)		38 (15,0)	13 (14,4)		
		TT	0 (0,0)	1 (1,5)		0 (0,0)	2 (8,3)		0 (0,0)	3 (3,3)		
		Todas	159 (100)	66 (100)		95 (100)	24 (100)		254 (100)	90 (100)		
18	mir-5189 rs56292801 (PM)	GG	43 (51,8)	39 (58,2)	0,3433	51 (53,1)	18 (81,8)	0,0102 AG/AA 0,25 (0,08-0,80)(dom)	94 (52,5)	57 (64,0)	0,0717	
		AG	26 (31,3)	20 (29,9)		41 (42,7)	3 (13,6)		67 (37,4)	23 (25,8)		
		AA	14 (16,9)	8 (11,9)		4 (4,2)	1 (4,5)		18 (10,1)	9 (10,1)		
		Todas	83 (100)	67 (100)		96 (100)	22 (100)		179 (100)	89 (100)		
19	mir-4707 rs2273626 (PM/seed)	AA	22 (27,2)	11 (16,4)	0,2876	31 (32,3)	2 (8,7)	0,0132 AC/CC 5,01 (1,10-22,72)(dom)	53 (29,9)	13 (14,4)	0,0041 AA 0,40 (0,20-0,77) (rec)	
		AC	34 (42,0)	32 (47,8)		45 (46,9)	15 (65,2)		79 (44,6)	47 (52,2)		
		CC	25 (30,9)	24 (35,8)		20 (20,8)	6 (26,1)		45 (25,4)	30 (33,3)		
		Todas	81 (100)	67 (100)		96 (100)	23 (100)		177 (100)	90 (100)		
20	mir-4431 rs6726779 (PM)	TT	68 (42,5)	24 (34,8)	0,2720	34 (35,8)	12 (63,2)	0,0272 CT 0,22 (0,07-0,75) CC 0,85 (0,20-3,62)(cod)	102 (40,0)	36 (40,9)	0,2998	
		CT	70 (43,8)	33 (47,8)		51 (53,7)	4 (21,1)		121 (47,5)	37 (42,0)		
		CC	22 (13,8)	12 (17,4)		10 (10,5)	3 (15,8)		32 (12,5)	15 (17,0)		
		Todas	160 (100)	69 (100)		95 (100)	19 (100)		255 (100)	88 (100)		
21	mir-5682 rs9877402 (PM)	AA	145 (91,8)	15 (83,3)	0,0749	88 (93,6)	17 (85,0)	0,0295 GG 0 (rec)	233 (92,5)	32 (84,2)	0,0021 GG 0 (rec)	
		AG	13 (8,2)	2 (11,1)		6 (6,4)	1 (5,0)		19 (7,5)	3 (7,9)		
		GG	0 (0,0)	1 (5,6)		0 (0,0)	2 (10,0)		0 (0,0)	3 (7,9)		
		Todas	158 (100)	18 (100)		94 (100)	20 (100)		252 (100)	41 (100)		
22	mir-4432 rs243080 (PM)	CC	49 (30,6)	21 (30,9)	0,0629	30 (31,6)	12 (57,1)	0,0303 CT/TT 0,35 (0,13-0,91)(dom)	79 (31,0)	33 (37,1)	0,0314 (cod)	
		CT	82 (51,2)	27 (39,7)		49 (51,6)	5 (23,8)		131 (51,4)	32 (36,0)		
		TT	29 (18,1)	20 (29,4)		16 (16,8)	4 (19,0)		45 (17,6)	24 (27,0)		
		Todas	160 (100)	68 (100)		95 (100)	21 (100)		255 (100)	89 (100)		
23	mir-499a rs3746444 (PM/seed)	TT	106 (66,2)	47 (68,1)	0,7304	64 (66,7)	18 (75,0)	0,0444 CC 6,71 (1,06-42,73)(rec)	170 (66,4)	65 (69,9)	0,4098	
		CT	48 (30,0)	20 (29,0)		30 (31,2)	3 (12,5)		78 (30,5)	23 (24,7)		
		CC	6 (3,8)	2 (2,9)		2 (2,1)	3 (12,5)		8 (3,1)	5 (5,4)		
		Todas	160 (100)	69 (100)		96 (100)	24 (100)		256 (100)	93 (100)		
24	mir-146a rs2910164 (PM)	GG	84 (52,5)	46 (66,7)	0,04534 CG/CC 0,55 (0,31-1,00)(dom)	60 (62,5)	18 (75,0)	0,2410 CG/CC 0,56 (0,20-1,53)(dom)	144 (56,2)	64 (68,8)	0,03254 CG/CC 0,58 (0,35-0,96)(dom)	
		CG	66 (41,2)	18 (26,1)		30 (31,2)	5 (20,8)		96 (37,5)	23 (24,7)		
		CC	10 (6,2)	5 (7,2)		6 (6,2)	1 (4,2)		16 (6,2)	6 (6,5)		
		Todas	160 (100)	69 (100)		96 (100)	24 (100)		256 (100)	93 (100)		
25	mir-4752 rs4112253 (PM)	CC	60 (37,5)	34 (49,3)	0,05378 GG 0,65 (0,42-1,01)(log)	43 (44,8)	12 (63,2)	0,1419 GG 0,82 (0,17-4,02)(rec)	103 (40,2)	46 (52,3)	0,03452 GG 0,67 (0,46-0,98)rec	
		CG	78 (48,8)	30 (43,5)		41 (42,7)	5 (26,3)		119 (46,5)	35 (39,8)		
		GG	22 (13,8)	5 (7,2)		12 (12,5)	2 (10,5)		34 (13,3)	7 (8,0)		
		Todas	160 (100)	69 (100)		96 (100)	19 (100)		256 (100)	88 (100)		
26	mir-6128 rs67042258 (PM)	GG	89 (56)	47 (69,1)	0,06157 AG 0,49 (0,25-0,94) AA 1,18 (0,37-3,82) (cod)	54 (56,2)	12 (54,5)	0,1430 AA 2,83 (0,75-10,67)(rec)	143 (56,1)	59 (65,6)	0,04218 AG 0,55 (0,32-0,96) AA 1,45 (0,60-3,51)(cod)	
		AG	62 (39)	16 (23,5)		35 (36,5)	6 (27,3)		97 (38,0)	22 (24,4)		
		AA	8 (5)	5 (7,4)		7 (7,3)	4 (18,2)		15 (5,9)	9 (10,0)		
		Todas	159 (100)	68 (100)		96 (100)	22 (100)		255 (100)	90 (100)		

Abreviaturas: PM, pre-maduro; M, maduro, dom, dominante; rec, recesivo; codom, codominante, log, log-aditivo

En cuanto al estudio de asociación por frecuencias alélicas, observamos 9 polimorfismos en 9 genes de miRNAs asociados con el riesgo a OS. De forma destacada, los SNPs localizados en los mir-4707 y mir-146a (rs2273626 y rs2910164, respectivamente) están localizados en la región *seed* del miRNA. Estos 9 polimorfismos también se encontraron asociados con el riesgo de OS en los análisis por frecuencias genotípicas (Tabla 34).

Tabla 34. Resultados positivos de los análisis de asociación por frecuencias alélicas entre SNPs en miRNAs y riesgo de OS en la población total.

Gen	SNP	Localización	Posición	Alelo	N control	N casos	OR (IC 95%)	P	
1	mir-576	rs77639117	premaduro	4q25	T	0,014	0,062	4,75 (1,81-12,46)	0,0005
2	mir-4707	rs2273626	Premaduro/seed	14q11	C	0,477	0,609	1,71 (1,18-2,47)	0,0044
3	mir-300	rs12894467	premaduro	14q32	T	0,371	0,489	1,62 (1,148-2,86)	0,0058
4	mir-4268	rs4674470	premaduro	2q35	T	0,763	0,858	4,99 (3,19-7,83)	0,0078
5	mir-3188	rs7247237	premaduro	19p13	T	0,309	0,414	1,57 (1,106-2,52)	0,0116
6	mir-4745	rs10422347	Maduro/premaduro	19p13	T	0,075	0,138	1,98 (1,15-3,41)	0,0124
7	mir-5682	rs9877402	premaduro	8q22	G	0,038	0,100	2,84 (1,15-7,01)	0,0188
8	mir-4752	rs4112253	premaduro	19p13	C	0,635	0,727	1,53 (1,05-2,24)	0,0256
9	mir-146a	rs2910164	Premaduro/seed	5q34	G	0,750	0,824	1,56 (1,008-2,41)	0,0449

2.3.6 ANÁLISIS *IN SILICO* EN POBLACIÓN ESPAÑOLA Y ESLOVENA

En la población conjunta, los SNPs en rs2910164 en mir-146a y rs4112253 en mir-4752 provocaron cambios en la estructura secundaria de los miRNAs (Figura 29).

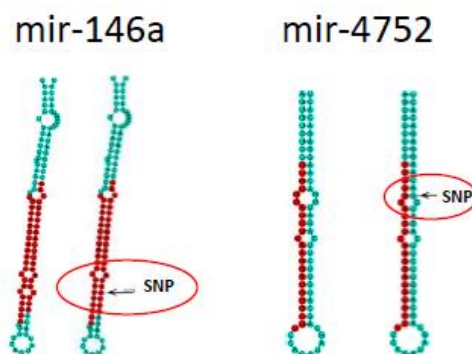


Figura 29. Estructura secundaria de los miRNAs con SNPs asociados al riesgo a desarrollar OS en la población española que cambiaban su estructura secundaria, predicho por la base de datos miRNASNP.

Anexo

1. META-ANÁLISIS EN LOS SNPS rs1690916 y rs2279744 en el gen *MDM2*

1.1 ANÁLISIS DE CALIDAD DE ESTUDIOS PARA META-ANÁLISIS DE rs1690916 y rs2279744

Tabla anexa 1. Características de los estudios incluidos en el MA de rs1690916.

Población	Método de genotipado	EHW	Calidad de estudios	Ref	Año
España	ARMS	S	S		2015 (PE)
Eslovenia	ARMS	S	S		2015 (PE)
Rusia	MALDI-TOF	S	S	(36)	2012
EEUU	Custom Infinium Beadchip	S	S	(35)	2011

Abreviaturas: EHW: Equilibrio de *Hardy-Weinberg*; S, sí; N, no; Ref: Referencia; PE: Presente estudio.

Tabla anexa 2. Características de los estudios elegidos para el MA de rs2279744.

Población	Método de genotipado	EHW	Calidad de estudios	Ref	Año
España	RFLP	S	S		2015 (PE)
Eslovenia	RFLP	S	S		2015 (PE)
EEUU	Custom Infinium Beadchip	S	S	(35)	2011
Australia	TaqMan	S	N	(34)	2011
Italia	Pirosecuenciación	S	S	(33)	2009

Abreviaturas: EHW: Equilibrio de *Hardy-Weinberg*; S, sí; N, no; Ref: Referencia; PE: Presente estudio.

1. 2. ANÁLISIS DE OMISIONES PARA VERIFICACIÓN DE HETEROGENEIDAD EN META-ANÁLISIS DE rs1690916

Tabla anexa 3. Resultados del análisis por omisiones del meta-análisis del SNP rs1690916.

Modelo alélico					
Estudio omitido	OR	95%CI	p valor	tau ²	I ²
España	0,81	0,41-1,60	0,55	0,29	0,80
Eslovenia	0,74	0,46-1,18	0,21	0,12	0,73
Rusia	1,02	0,58-1,81	0,94	0,20	0,83
EEUU	1,03	0,57-1,86	0,93	0,20	0,72
Estimador global	0,89	0,54-1,45	0,63	0,19	0,78
Modelo codominante					
Estudio omitido	OR	95%CI	p valor	tau ²	I ²
España	0,71	0,16-3,24	0,66	13993,00	0,79
Eslovenia	0,52	0,21-1,30	0,16	0,40	0,63
Rusia	1,04	0,28-3,83	0,95	1,04	0,81
EEUU	1,14	0,33-3,96	0,83	0,81	0,68
Estimador global	0,80	0,28-2,29	0,67	0,84	0,75
Modelo recesivo					
Estudio omitido	OR	95%CI	p valor	tau ²	I ²
España	0,74	0,27-2,01	0,55	0,52	0,66
Eslovenia	0,62	0,34-1,14	0,13	0,09	0,31
Rusia	0,88	0,37-2,09	0,77	0,40	0,69
EEUU	1,09	0,59-2,00	0,79	0,04	0,13
Estimador global	0,80	0,40-1,60	0,53	0,27	0,56
Modelo dominante					
Estudio omitido	OR	95%CI	p valor	tau ²	I ²
España	0,77	0,30-2,01	0,60	0,52	0,74
Eslovenia	0,69	0,36-1,32	0,26	0,23	0,73
Rusia	1,11	0,51-2,45	0,79	0,35	0,79
EEUU	1,07	0,38-2,99	0,90	0,61	0,76
Estimador global	0,87	0,44-1,755	0,70	0,35	0,76

1. 3 ANÁLISIS DE SESGO DE PUBLICACIÓN EN META-ANÁLISIS DE rs1690916 y rs2279744

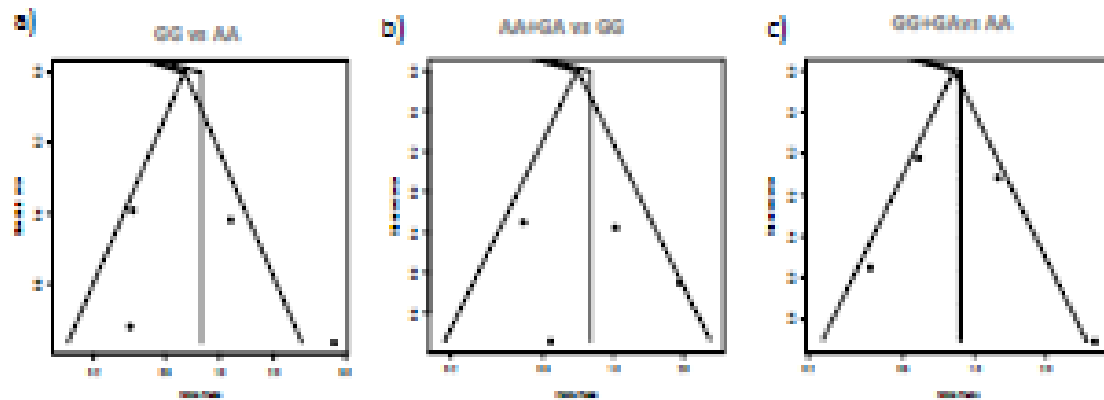


Figura anexo 1. Funnel plots de los test de Egger para la comparación de frecuencias genotípicas rs1690916. a) comparación GG vs AA; b) comparación AA+GA vs GG; c) GG+GA vs AA.

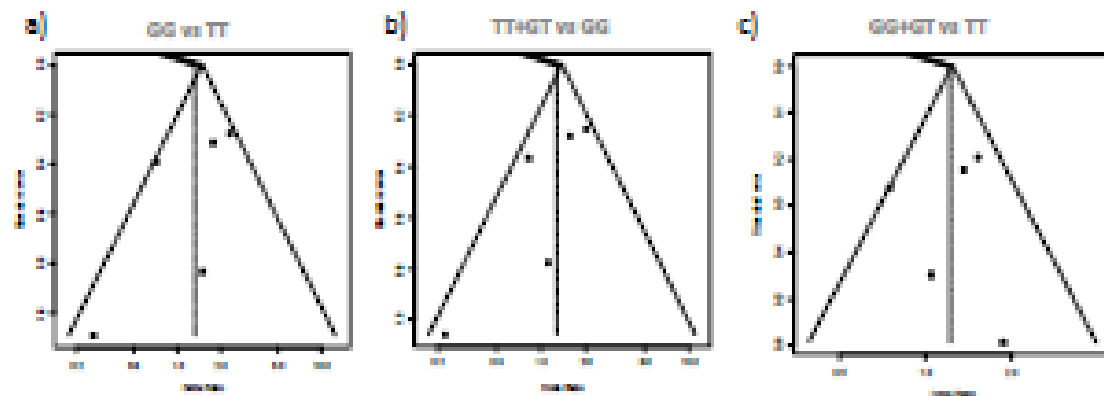


Figura anexo 2. Funnel plots de los test de Egger para la comparación de frecuencias genotípicas para rs2279744. a) comparación GG vs TT; b) comparación TT+GT vs GG; c) comparación GG+GT vs TT.

2. ESTUDIO EN GENES DE PROCESAMIENTO DE MIRNAS

2.1 EXCLUSIÓN DE SNPS

Tabla anexa 4. SNPs excluidos en el estudio de genes de procesamiento de miRNAs.

	SNP	Gen	Alelos	Razón exclusión
1	rs1003226	<i>CNOT4</i>	T>C	Fallo genotipado
2	rs11738060	<i>CNOT6</i>	T>A	Fallo genotipado
3	rs34610323	<i>GEMIN4</i>	C>T	Fallo genotipado
4	rs11061209	<i>RAN</i>	G>A	Fallo genotipado
5	rs493760	<i>DROSHA</i>	T>C	Fallo genotipado
6	rs42318	<i>CNOT3</i>	G>A	No EHW
7	rs3757	<i>DGCR8</i>	G>A	No EHW
8	rs3742330	<i>DICER1</i>	A>G	No EHW
9	rs7813	<i>GEMIN4</i>	C>T	No EHW
10	rs910924	<i>GEMIN4</i>	C>T	No EHW
11	rs816736	<i>GEMIN5</i>	T>C	No EHW
12	rs55656741	<i>DROSHA</i>	G>A	No EHW
13	rs7719666	<i>DROSHA</i>	C>T	No EHW
14	rs2413621	<i>TNRC6B</i>	T>C	No EHW
15	rs470113	<i>TNRC6B</i>	A>G	No EHW

2.1 RESULTADOS DE ASOCIACIÓN BRUTOS

Tabla anexa 5. SNPs estudiados en el estudio de genes de procesamiento de miRNAs (continua).

N	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (IC 95%)	P
1	rs139919	<i>TNRC6B</i>	TT	247(72)	52(67,5)	1,23(0,75-2,03)	0,4209log
			TC	93(27,1)	24(31,2)		
			CC	3(0,9)	1(1,3)		
2	rs197412	<i>GEMIN3</i>	TT	139(40,4)	31(39,7)	1	0,5565rec
			CT	152(44,2)	37(47,4)	0,81(0,39-1,67)	
			CC	53(15,4)	10(12,8)		
3	rs636832	<i>EIF2C1</i>	GG	283(81,6)	63(79,7)	1	0,7122dom
			AG	61(17,6)	16(20,3)	1,12(0,61-2,07)	
			AA	3(0,9)	0(0)		
4	rs322825	<i>SND1</i>	CC	162(47,1)	33(42,9)	1	0,266rec
			CT	152(44,2)	34(44,2)	1,56(0,73-3,35)	
			TT	30(8,7)	10(13)		
5	rs2293939	<i>EIF2C2</i>	GG	188(55,6)	50(64,9)	1	0,1329dom
			GA	132(39,1)	23(29,9)	0,68(0,4-1,13)	
			AA	18(5,3)	4(5,2)		
6	rs1209904	<i>DICER1</i>	CC	194(56,1)	47(59,5)	1	0,3997rec
			CT	127(36,7)	24(30,4)	1,45(0,63-3,34)	
			TT	25(7,2)	8(10,1)		
7	rs6877842	<i>DROSHA</i>	GG	231(67,7)	55(69,6)	0,96(0,61-1,51)	0,8467log
			CG	99(29)	21(26,6)		
			CC	11(3,2)	3(3,8)		
8	rs6497759	<i>TNRC6A</i>	GG	201(59,1)	47(59,5)	1	0,6324rec
			AG	117(34,4)	28(35,4)	0,77(0,2-62,3)	
			AA	22(6,5)	4(5,1)		
9	rs42318	<i>CNOT3</i>	CC	183(53,4)	35(47,9)	1	0,3534codom
			CT	121(35,3)	32(43,8)	1,38(0,81-2,35)	
			TT	39(11,4)	6(8,2)	0,8(0,32-2,04)	
10	rs417309	<i>DGCR8</i>	GG	302(87,3)	70(88,6)	1	0,2631rec
			AG	41(11,8)	7(8,9)	2,97(0,49-18,08)	
			AA	3(0,9)	2(2,5)		
11	rs470113	<i>TNRC6B</i>	AA	249(72,4)	53(68,8)	1	0,0372rec
			AG	93(27)	21(27,3)	6,93(1,14-42,22)	
			GG	2(0,6)	3(3,9)		
12	rs3757	<i>DGCR8</i>	GG	189(55,1)	36(47,4)	1	0,06519rec
			AG	141(41,1)	33(43,4)	2,58(0,99-6,69)	
			AA	13(3,8)	7(9,2)		
13	rs3764942	<i>SMAD5</i>	CC	301(87,2)	71(89,9)	1	0,5121dom
			CT	40(11,6)	7(8,9)	0,77(0,35-1,71)	
			TT	4(1,2)	1(1,3)		
14	rs11644694	<i>CNOT1</i>	GG	307(88,2)	70(89,7)	1	0,6991codom
			AG	41(11,8)	8(10,3)	0,86(0,38-1,91)	
			AA	0(0)	0(0)		
15	rs37060	<i>CNOT1</i>	GG	208(59,8)	45(57,7)	1	0,5923rec
			AG	123(35,3)	28(35,9)	1,33(0,48-3,73)	
			AA	17(4,9)	5(6,4)		
16	rs11866002	<i>CNOT1</i>	CC	134(38,7)	46(59)	1	0,001153dom
			CT	174(50,3)	26(33,3)	0,44(0,27-0,73)	
			TT	38(11)	6(7,7)		
17	rs2740348	<i>GEMIN4</i>	CC	270(78,3)	64(83,1)	1	0,3333dom
			CG	69(20)	12(15,6)	0,73(0,3-81,4)	
			GG	6(1,7)	1(1,3)		
18	rs1062923	<i>GEMIN4</i>	AA	255(73,3)	53(67,9)	1,16(0,7-11,9)	0,2863log
			AG	87(25)	25(32,1)		
			GG	6(1,7)	0(0)		

Tabla anexa 5. SNPs estudiados en el estudio de genes de procesamiento de miRNAs (continua).

N	SNP	Gen	Genotipo	N(%control)	N(%casos)	OR (IC 95%)	P
19	rs7813	<i>GEMIN4</i>	AA	115(33,2)	34(44,2)	0,69(0,47-1,02)	0,05962log
			AG	184(53,2)	36(46,8)		
			GG	47(13,6)	7(9,1)		
20	rs1106841	<i>XPO5</i>	AA	113(33,5)	26(33,8)	1	0,05029rec
			AC	166(49,3)	30(39)	1,8(1,01-3,21)	
			CC	58(17,2)	21(27,3)		
21	rs3805500	<i>DROSHA</i>	AA	125(37)	35(45,5)	1	0,1711dom
			AG	158(46,7)	31(40,3)	0,7(0,43-1,16)	
			GG	55(16,3)	11(14,3)		
22	rs910924	<i>GEMIN4</i>	GG	165(47,4)	39(52,7)	1	0,2486rec
			AG	163(46,8)	33(44,6)	0,46(0,1-1,99)	
			AA	20(5,7)	2(2,7)		
23	rs1057035	<i>DICER1</i>	TT	156(45,1)	37(48,1)	1	0,6214rec
			CT	152(43,9)	30(39)	1,21(0,57-2,55)	
			CC	38(11)	10(13)		
24	rs13078	<i>DICER1</i>	TT	220(63,8)	49(62)	1	0,5008rec
			AT	111(32,2)	28(35,4)	0,61(0,142,76)	
			AA	14(4,1)	2(2,5)		
25	rs816736	<i>GEMIN5</i>	AA	344(98,9)	75(96,2)	2,21(0,6-8,13)	0,1185log
			AG	3(0,9)	3(3,8)		
			GG	1(0,3)	0(0)		
26	rs1640299	<i>DGCR8</i>	GG	85(24,4)	17(21,8)	1	0,1782rec
			TG	182(52,1)	48(61,5)	0,65(0,34-1,24)	
			TT	82(23,5)	13(16,7)		
27	rs10719	<i>DROSHA</i>	GG	193(55,9)	47(64,4)	1	0,1428codom
			AG	134(38,8)	20(27,4)	0,61(0,35-1,08)	
			AA	18(5,2)	6(8,2)	1,37(0,52-3,64)	
28	rs1106042	<i>PIWIL1</i>	GG	304(88,6)	73(92,4)	1	0,309dom
			AG	36(10,5)	6(7,6)	0,640,26-1,57)	
			AA	3(0,9)	0(0)		
29	rs563002	<i>GEMIN3</i>	TT	217(62,7)	53(68,8)	1	0,3083dom
			CT	113(32,7)	21(27,3)	0,76(0,45-1,29)	
			CC	16(4,6)	3(3,9)		
30	rs784567	<i>TARBP2P</i>	AA	80(23,7)	17(22,7)	1	0,7849rec
			AG	181(53,6)	42(56)	0,92(0,51,69)	
			GG	77(22,8)	16(21,3)		
31	rs10035440	<i>DROSHA</i>	TT	213(62,8)	47(60,3)	1,12(0,74-1,68)	0,5958log
			CT	109(32,2)	26(33,3)		
			CC	17(5)	5(6,4)		
32	rs1974777	<i>GEMIN5</i>	TT	273(78,4)	63(80,8)	1	0,647dom
			CT	72(20,7)	14(17,9)	0,87(0,47-1,61)	
			CC	3(0,9)	1(1,3)		
33	rs14035	<i>RAN</i>	CC	138(40,4)	32(42,1)	1	0,7252rec
			CT	164(48)	34(44,7)	1,14(0,54-2,4)	
			TT	40(11,7)	10(13,2)		
34	rs3812265	<i>CNOT4</i>	CC	212(63,1)	39(49,4)	1	0,02599dom
			CT	109(32,4)	37(46,8)	1,75(1,07-2,87)	
			TT	15(4,5)	3(3,8)		
35	rs2292778	<i>EIF2C2</i>	AA	90(25,9)	26(33,3)	1	0,06848codom
			AG	175(50,3)	28(35,9)	0,55(0,311)	
			GG	83(23,9)	24(30,8)	10,5(31,88)	
36	rs2257082	<i>XPO5</i>	GG	202(58,4)	53(67,9)	0,7(0,45-1,09)	0,1093log
			GA	123(35,5)	22(28,2)		
			AA	21(6,1)	3(3,8)		

Tabla anexa 5. SNPs analizados en el estudio de genes de procesamiento de miRNAs (continua).

N	SNP	Gen	Genotipo	N(%control)	N(%casos)	OR (IC 95%)	P
37	rs2413621	<i>TNRC6B</i>	TT	192(55,2)	48(60,8)	1	0,3645dom
			CT	119(34,2)	24(30,4)	0,79(0,48-1,31)	
			CC	37(10,6)	7(8,9)		
38	rs2287584	<i>DROSHA</i>	TT	186(53,4)	47(59,5)	1	0,3285dom
			CT	143(41,1)	26(32,9)	0,78(0,48-1,28)	
			CC	19(5,5)	6(7,6)		
39	rs3744741	<i>GEMIN4</i>	CC	260(74,9)	55(73,3)	1	0,1403rec
			CT	85(24,5)	18(24)	4,73(0,66-34,1)	
			TT	2(0,6)	2(2,7)		
40	rs2227301	<i>XPO5</i>	CC	228(65,5)	46(58,2)	1	0,2263dom
			CT	106(30,5)	29(36,7)	1,36(0,83-2,24)	
			TT	14(4)	4(5,1)		
41	rs17151639	<i>SND1</i>	AA	189(54,3)	40(51,3)	1	0,6281dom
			AG	128(36,8)	31(39,7)	1,13(0,69-1,85)	
			GG	31(8,9)	7(9)		
42	rs6865950	<i>GEMIN5</i>	GG	276(79,5)	68(87,2)	1	0,10672dom
			AG	69(19,9)	9(11,5)	0,57(0,28-1,17)	
			AA	2(0,6)	1(1,3)		
43	rs35987994	<i>DGCR8</i>	AA	330(95,1)	75(94,9)	1	0,8162codom
			AG	16(4,6)	4(5,1)	1,1(0,36-3,38)	
			GG	1(0,3)	0(0)	0(0)	
44	rs34324334	<i>XPO5</i>	CC	298(86,9)	66(84,6)	1	0,6028codom
			CT	45(13,1)	12(15,4)	1,2(0,6-2,4)	
			TT	0(0)	0(0)	0(0)	
45	rs6877400	<i>CNOT6</i>	TT	274(78,5)	61(78,2)	1	0,6554rec
			CT	68(19,5)	16(20,5)	0,63(0,08-5,23)	
			CC	7(2)	1(1,3)		
46	rs7735863	<i>DROSHA</i>	GG	263(76)	65(83,3)	1	0,15125dom
			AG	73(21,1)	10(12,8)	0,63(0,33-1,21)	
			AA	10(2,9)	3(3,8)		
47	rs639174	<i>DROSHA</i>	CC	166(47,6)	39(50)	1	0,2298rec
			CT	154(44,1)	29(37,2)	1,62(0,76-3,49)	
			TT	29(8,3)	10(12,8)		
48	rs3764941	<i>SMAD5</i>	TT	158(46,2)	42(53,8)	1	0,2226dom
			GT	150(43,9)	27(34,6)	0,74(0,45-1,21)	
			GG	34(9,9)	9(11,5)		
49	rs3823994	<i>SND1</i>	AA	163(46,8)	47(59,5)	1	0,04182dom
			AT	157(45,1)	28(35,4)	0,6(0,37-0,99)	
			TT	28(8)	4(5,1)		
50	rs3763425	<i>CNOT4</i>	CC	259(74,6)	58(75,3)	1	0,9002dom
			CT	79(22,8)	17(22,1)	0,96(0,54-1,71)	
			TT	9(2,6)	2(2,6)		
51	rs3792830	<i>DROSHA</i>	AA	312(89,9)	69(87,3)	1	0,06664rec
			AG	34(9,8)	8(10,1)	8,99(0,810-0,37)	
			GG	1(0,3)	2(2,5)		
52	rs4867329	<i>DROSHA</i>	AA	106(30,4)	22(28,2)	1,09(0,78-1,53)	0,621log
			AC	166(47,6)	37(47,4)		
			CC	77(22,1)	19(24,4)		
53	rs7719666	<i>DROSHA</i>	CC	122(36,2)	26(36,1)	1	0,07933rec
			CT	145(43)	24(33,3)	1,68(0,95-2,96)	
			TT	70(20,8)	22(30,6)		
54	rs9606248	<i>DGCR8</i>	AA	205(58,9)	46(61,3)	1	0,1174rec
			AG	126(36,2)	28(37,3)	0,26(0,03-2,01)	
			GG	17(4,9)	1(1,3)		

Tabla anexa 5. SNPs estudiados en el estudio de genes de procesamiento de miRNAs.

N	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (IC 95%)	p
55	rs9611280	<i>TNRC6B</i>	GG	273(78,4)	65(83,3)	1	0,3256dom
			AG	70(20,1)	13(16,7)	0,73(0,38-1,39)	
			AA	5(1,4)	0(0)		
56	rs4821943	<i>TNRC6B</i>	AA	170(49,4)	44(57,1)	1	0,2196dom
			AG	143(41,6)	26(33,8)	0,73(0,45-1,21)	
			GG	31(9)	7(9,1)		
57	rs197388	<i>GEMIN3</i>	AA	242(71,2)	55(72,4)	1	0,4621rec
			AT	89(26,2)	20(26,3)	0,49(0,06-3,93)	
			TT	9(2,6)	1(1,3)		
58	rs17408716	<i>DROSHA</i>	AA	302(88,3)	72(93,5)	1	0,1595codom
			AG	40(11,7)	5(6)	0,52(0,2-1,38)	
			GG	0(0)	0(0)		
59	rs17676986	<i>SND1</i>	CC	246(71,3)	62(80,5)	1	0,09075dom
			CT	95(27,5)	13(16,9)	0,6(0,33-1,11)	
			TT	4(1,2)	2(2,6)		
60	rs6884823	<i>DROSHA</i>	GG	281(82,2)	68(87,2)	1	0,2728dom
			AG	54(15,8)	10(12,8)	0,68(0,33-1,39)	
			AA	7(2)	0(0)		
61	rs4961280	<i>EIF2C2</i>	CC	241(69,1)	57(72,2)		0,5385log
			AC	101(28,9)	21(26,6)	0,86(0,52-1,41)	
			AA	7(2)	1(1,3)		
62	rs55656741	<i>DROSHA</i>	GG	126(36,5)	29(36,7)	1	0,5388rec
			AG	147(42,6)	31(39,2)	1,2(0,67-2,14)	
			AA	72(20,9)	19(24,1)		
63	rs595961	<i>EIF2C1</i>	AA	242(71,4)	58(75,3)	1	0,4824dom
			AG	87(25,7)	17(22,1)	0,82(0,46-1,44)	
			GG	10(2,9)	2(2,6)		
64	rs7755135	<i>XPO5</i>	GG	248(71,7)	53(67,9)	1	0,1069rec
			AG	92(26,6)	21(26,9)	3,06(0,84-11,13)	
			AA	6(1,7)	4(5,1)		
65	rs10506586	<i>CNOT2</i>	CC	301(82,7)	61(78,2)	1	0,3594dom
			AC	59(16,2)	16(20,5)	1,33(0,73-2,43)	
			AA	4(1,1)	1(1,3)		
66	rs197414	<i>GEMIN3</i>	CC	268(80)	54(76,1)	1	0,421log
			AC	61(18,2)	15(21,1)	1,24(0,74-2,1)	
			AA	6(1,8)	2(2,8)		
67	rs3742330	<i>DICER1</i>	AA	246 (72,4)	61 (78,2)	1	0,28 codom
			AG	94 (27,6)	17 (21,8)	0,73 (0,41-1,31)	
			GG	0 (0)	0 (0)	0(0)	
68	rs11061209	Fallido					
69	rs11738060	Fallido					
70	rs34610323	Fallido					
71	rs493760	Fallido					
72	rs1003226	Fallido					

3. ESTUDIO EN GENES DE PRE-MIRNAS

3.1 EXCLUSIÓN DE SNPS

Tabla anexa 6. SNPs excluidos en el estudio de pre-miRNAs (continúa).

	SNP	Gen	Alelos	Razón exclusión
1	rs10461441	hsa-mir-548ae-2	T:T	Fallo genotipado
2	rs1077020	hsa-mir-943	T:T	Fallo genotipado
3	rs10878362	hsa-mir-6074	T:T	Fallo genotipado
4	rs11014002	hsa-mir-603	T:T	Fallo genotipado
5	rs11032942	hsa-mir-1343	T:T	Fallo genotipado
6	rs11237828	hsa-mir-5579	T:T	Fallo genotipado
7	rs11651671	hsa-mir-548at	T:T	Fallo genotipado
8	rs12197631	hsa-mir-548a-1	T:T	Fallo genotipado
9	rs12355840	hsa-mir-202	T:C	No en EHW Eslovenia, España +Eslovenia
10	rs12451747	hsa-mir-1269b	T:T	Fallo genotipado
11	rs12473206	hsa-mir-4433	T:T	Fallo genotipado
12	rs12523324	hsa-mir-4277	T:T	Fallo genotipado
13	rs13186787	hsa-mir-1294	T:T	Fallo genotipado
14	rs13299349	hsa-mir-3152	G:A	No en EHW España
15	rs1414273	hsa-mir-548ac	T:T	Fallo genotipado
16	rs17022749	hsa-mir-5700	T:T	Fallo genotipado
17	rs2060455	hsa-mir-4511	T:T	Fallo genotipado
18	rs2241347	hsa-mir-3130-1	T:T	Fallo genotipado
19	rs2292832	hsa-mir-149	T:T	Fallo genotipado
20	rs257095	hsa-mir-4636	A:G	No en EHW España
21	rs2663345	hsa-mir-3183	T:T	Fallo genotipado
22	rs3112399	hsa-mir-4803	T:A	No en EHW España, España+Eslovenia
23	rs34115976	hsa-mir-577	C:G	No en EHW España
24	rs35196866	hsa-mir-4669	T:T	Fallo genotipado
25	rs35613341	hsa-mir-5189	C:G	No en EHW España, España+Eslovenia
26	rs4285314	hsa-mir-3135b	T:T	Fallo genotipado
27	rs487571	hsa-mir-5680	T:T	Fallo genotipado
28	rs56088671	hsa-mir-4424	T:T	Fallo genotipado
29	rs56195815	hsa-mir-548aw	T:T	Fallo genotipado
30	rs56292801	hsa-mir-5189	G:A	No en EHW España
31	rs58450758	hsa-mir-559	T:T	Fallo genotipado

Tabla anexa 6. SNPs excluidos en el estudio de pre-miRNAs.

	SNP	Gen	Alelos	Razón exclusión
32	rs60308683	hsa-mir-4762	T:T	Fallo genotipado
33	rs6062431	hsa-mir-4326	G:C	No en EHW España, España+Eslovenia
34	rs62376935	hsa-mir-585	C:T	No en EHW Eslovenia, España+Eslovenia
35	rs641071	hsa-mir-4482	T:T	Fallo genotipado
36	rs6505162	hsa-mir-423	T:T	Fallo genotipado
37	rs66507245	hsa-mir-4731	T:T	Fallo genotipado
38	rs66683138	hsa-mir-3622a	T:T	Fallo genotipado
39	rs67339585	MIR3910-1, MIR3910-2	T:T	Fallo genotipado
40	rs6787734	hsa-mir-3135a	T:T	Fallo genotipado
41	rs67976778	hsa-mir-4305	T:T	Fallo genotipado
42	rs6841938	hsa-mir-1255b-1	T:T	Fallo genotipado
43	rs6997249	hsa-mir-3686	T:T	Fallo genotipado
44	rs701213	hsa-mir-4427	T:T	Fallo genotipado
45	rs7070684	hsa-mir-548aj-2	T:T	Fallo genotipado
46	rs72502717	hsa-mir-3689f	T:T	Fallo genotipado
47	rs72855836	hsa-mir-3976	G:A	No en EHW en Eslovenia
48	rs73112689	hsa-mir-4459	T:T	Fallo genotipado
49	rs73147065	hsa-mir-647	T:T	Fallo genotipado
50	rs73177830	hsa-mir-4532	T:T	Fallo genotipado
51	rs73235381	hsa-mir-548h-4	T:T	Fallo genotipado
52	rs73410309	hsa-mir-4739	T:T	Fallo genotipado
53	rs7500280	hsa-mir-4719	T:T	Fallo genotipado
54	rs77055126	hsa-mir-1303	T:T	Fallo genotipado
55	rs832733	hsa-mir-4698	T:T	Fallo genotipado
56	rs850108	hsa-mir-550a-3	T:T	Fallo genotipado
57	rs897984	hsa-mir-4519	T:T	Fallo genotipado
58	rs9295535	hsa-mir-5689	T:T	Fallo genotipado
59	rs9913045	hsa-mir-548h-3	T:T	Fallo genotipado
60	seq_rs111803974	MIR3908	T:T	Fallo genotipado
61	seq_rs163642	MIR4436B2	T:T	Fallo genotipado

3.1 RESULTADOS DE ASOCIACIÓN BRUTOS

Tabla anexa 7. Resultados de SNPs en miRNAs en la población española (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P
1	rs10061133	hsa-mir-449b	AA	135(84,4)	54(80,6)	1	0,4917 codom
			AG	25(15,6)	13(19,4)	1,3(0,62-2,73)	
			GG	0((0,0))	0((0,0))		
2	rs10173558	mir-1302-4	TT	124(77,5)	50(72,5)	1,32(0,72-2,42)	0,3733 log
			CT	35(21,9)	18(26,1)		
			CC	1(0,6)	1(1,4)		
3	rs10406069	hsa-mir-5196	GG	110(69,6)	43(62,3)	1,05(0,64-1,74)	0,02068 log
			AG	39(24,7)	26(37,7)		
			AA	9(5,7)	0(0,0)		
4	rs10422347	hsa-mir-4745	CC	138(87,3)	51(75,0)	1	0,02554 dom
			CT	19(12,0)	17(25,0)	2,30(1,12-4,73)	
			TT	1(0,6)	0(0,0)		
5	rs10461441	hsa-mir-548ae-2	FALLIDO				
6	rs10505168	hsa-mir-2053	AA	78(49,1)	25(36,2)	1	0,008691 codom
			AG	65(40,9)	42(60,9)	2,02(1,11-3,65)	
			GG	16(10,1)	2(2,9)	0,39(0,08-1,81)	
7	rs1055070	hsa-mir-4700	TT	138(86,2)	62(89,9)	1	0,4434 codom
			GT	22(13,8)	7(10,1)	0,71(0,29-1,75)	
			GG	0(0,0)	0((0,0))		
8	rs1077020	hsa-mir-943	FALLIDO				
9	rs10878362	hsa-mir-6074	FALLIDO				
10	rs10934682	hsa-mir-544b	TT	115(71,9)	50(72,5)	1	0,1895 rec
			GT	44(27,5)	17(24,6)	4,75(0,42-53,24)	
			GG	1(0,6)	2(2,9)		
11	rs11014002	hsa-mir-603	FALLIDO				
12	rs11032942	hsa-mir-1343	FALLIDO				
13	rs11156654	mir-624	TT	103(64,4)	44(63,8)	1	0,2326 rec
			AT	48(30,0)	18(26,1)	1,89(0,68-5,31)	
			AA	9(5,6)	7(10,1)		
14	rs11237828	hsa-mir-5579	FALLIDO				
15	rs11259096	hsa-mir-1265	TT	146(91,2)	66(95,7)	1	0,2217 cod
			CT	14(8,8)	3(4,3)	0,47(0,13-1,71)	
			CC	0(0,0)	0(0,0)		
16	rs11614913	hsa-mir-196a-2	CC	55(34,4)	28(40,6)	1	0,3722 dom
			CT	80(50,0)	31(44,9)	0,77(0,43-1,37)	
			TT	25(15,6)	10(14,5)		
17	rs11651671	hsa-mir-548at	FALLIDO				
18	rs11713052	hsa-mir-5092	CC	149(93,1)	66(95,7)	1	0,4502 codom
			CG	11(6,9)	3(4,3)	0,62(0,17-2,28)	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
19	rs11714172	hsa-mir-4792	TT	61(38,4)	27(39,1)	1	0,6803 rec
			GT	76(47,8)	31(44,9)	1,18(0,54-2,59)	
			GG	22(13,8)	11(15,9)		
20	rs11907020	hsa-mir-3192	TT	149(93,1)	67(98,5)	1	0,06236 codom
			CT	11(6,9)	1(1,5)	0,2(0,03-1,6)	
			CC	0(0,0)	0(0,0)		
21	rs11983381	hsa-mir-4653	AA	119(74,4)	48(73,8)	1	0,1729 rec
			AG	40(25,0)	15(23,1)	5,05(0,45-56,66)	
			GG	1(0,6)	2(3,1)		
22	rs12197631	hsa-mir-548a-1	FALLIDO				

Tabla anexa 7. Resultados de SNPs en miRNAs en la población española (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P
23	rs12355840	hsa-mir-202	TT	104(65,4)	10(52,6)	1	0,2802 dom
			CT	44(27,7)	8(42,1)	1,70(0,65-4,44)	
			CC	11(6,9)	1(5,3)		
24	rs12402181	hsa-mir-202	GG	121(75,6)	48(69,6)	1,36(0,75-2,47)	0,3078 log
			AG	38(23,8)	20(29,0)		
			AA	1(0,6)	1(1,4)		
25	rs12451747	hsa-mir-1269b	FALLIDO				
26	rs12456845	hsa-mir-4744	TT	150 94,3	63 91,3	1.00	0.4068 codom
			CT	9 5,7	6 8,7	1.59 0.54 4.65	
			CC	0(0,0)	0(0,0)		
27	rs12473206	hsa-mir-4433	FALLIDO				
28	rs12512664	hsa-mir-4274	AA	41(25,8)	20(29,9)	1	0,5320 dom
			AG	89(56,0)	35(52,2)	0,82(0,43-1,54)	
			GG	29(18,2)	12(17,9)		
29	rs12523324	hsa-mir-4277	FALLIDO				
30	rs12780876	hsa-mir-4293	TT	87(55,1)	39(57,4)	1	0,7504 dom
			AT	62(39,2)	25(36,8)	0,91(0,51-1,62)	
			AA	9(5,7)	4(5,9)		
31	rs12803915	hsa-mir-612	GG	109(68,1)	39(59,1)	1	0,1971 dom
			AG	45(28,1)	25(37,9)	1,48(0,82-2,68)	
			AA	6(3,8)	2(3,0)		
32	rs12879262	hsa-mir-4309	GG	111(69,8)	39(56,5)	1,43(0,85-2,42)	0,02234 log
			CG	43(27,0)	30(43,5)		
			CC	5(3,1)	0(0,0)		
33	rs12894467	hsa-mir-300	CC	74(46,2)	19(27,5)	2,01(1,32-3,06)	0,0009921 log
			CT	71(44,4)	34(49,3)		
			TT	15(9,4)	16(23,2)		
34	rs13186787	hsa-mir-1294	FALLIDO				
35	rs13299349	hsa-mir-3152	GG	69(43,4)	5(26,3)	1	0,14348 dom
			AG	60(37,7)	11(57,9)	2,15(0,74-6,25)	
			AA	30(18,9)	3(15,8)		
36	rs1414273	hsa-mir-548ac	FALLIDO				
37	rs1439619	hsa-mir-3175	CC	47(29,4)	4(21,1)	1	0,4351 dom
			AC	79(49,4)	11(57,9)	1,56(0,49-4,95)	
			AA	34(21,2)	4(21,1)		
38	rs1572687	hsa-mir-5007	CC	49(30,8)	19(27,5)	1	0,4529
			CT	73(45,9)	37(53,6)	0,77(0,38-1,55)	
			TT	37(23,3)	13(18,8)		
39	rs1683709	hsa-mir-3612	CC	103(64,4)	48(69,6)	1	0,4445 dom
			CT	52(32,5)	18(26,1)	0,79(0,43-1,45)	
			TT	5(3,1)	3(4,3)		
40	rs17022749	hsa-mir-5700	FALLIDO				
41	rs17091403	hsa-mir-2110	CC	131(81,9)	59(85,5)	1	0,4970 dom
			CT	26(16,2)	10(14,5)	0,77(0,35-1,67)	
			TT	3(1,9)	0(0,0)		
42	rs17111728	hsa-mir-4422	TT	142(88,8)	61(88,4)	1	0,9401 codom
			CT	18(11,2)	8(11,6)	1,03(0,43-2,51)	
			CC	0(0,0)	0(0,0)		
43	rs174561	mir-1908	TT	48(44,0)	32(54,2)	1	0,20629 dom
			CT	50(45,9)	18(30,5)	0,66(0,35-1,25)	
			CC	11(10,1)	9(15,3)		
44	rs17737028	hsa-mir-3143	AA	158(98,8)	67(97,1)	1	0,4025
			AG	2(1,2)	2(2,9)	2,36(0,33-17,09)	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		

Tabla anexa 7. Resultados de SNPs en miRNAs en la población española (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%control)	N(%casos)	OR (95%IC)	P
45	rs17759989	hsa-mir-633	AA	154(96,2)	65(94,2)	1	0,4974 codom 1,58(0,43-5,78)
			AG	6(3,8)	4(5,8)		
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
46	rs17797090	hsa-mir-3652	GG	126(78,8)	52(75,4)	1,08(0,58-1,99)	0,5072 log
			AG	31(19,4)	17(24,6)		
			AA	3(1,9)	0(0,0)		
47	rs17885221	hsa-mir-4733	CC	146(91,8)	63(92,6)	1	0,8324 codom 0,89(0,3-2,61)
			CT	13(8,2)	5(7,4)		
			TT	0(0,0)	0(0,0)		
48	rs2042253	hsa-mir-5197	AA	93(58,1)	41(59,4)	0,82(0,49-1,36)	0,1814 log
			AG	59(36,9)	28(40,6)		
			GG	8(5,0)	0(0,0)		
49	rs2043556	hsa-mir-605	AA	102(63,8)	41(62,1)	1	0,5997 rec 1,41(0,40-4,99)
			AG	51(31,9)	21(31,8)		
			GG	7(4,4)	4(6,1)		
50	rs2060455	hsa-mir-4511	FALLIDO				
51	rs2070960	hsa-mir-3620	CC	141(88,7)	53(80,3)	2,00(0,95-4,21)	0,0929
			CT	18(11,3)	12(18,2)		
			TT	0(0,0)	1(1,5)		
52	rs2114358	hsa-mir-1206	TT	56(35,2)	22(31,9)	1	0,6246 dom 1,16(0,64-2,12)
			CT	72(45,3)	33(47,8)		
			CC	31(19,5)	14(20,3)		
53	rs215383	hsa-mir-4494	GG	106(66,7)	49(73,1)	0,74(0,42-1,30)	0,2831 log
			AG	48(30,2)	17(25,4)		
			AA	5(3,1)	1(1,5)		
54	rs2241347	hsa-mir-3130-1	FALLIDO				
55	rs2273626	hsa-mir-4707	CC	25(30,9)	24(35,8)	1	0,1146 rec 0,53(0,23-1,19)
			AC	34(42,0)	32(47,8)		
			AA	22(27,2)	11(16,4)		
56	rs2289030	hsa-mir-492	CC	130(81,2)	60(87,0)	0,92(0,47-1,83)	0,005695 log
			CG	30(18,8)	6(8,7)		
			GG	0(0,0)	3(4,3)		
57	rs2291418	hsa-mir-1229	CC	151(94,4)	64(92,8)	1,15(0,41-3,24)	0,6786 log
			CT	8(5,0)	5(7,2)		
			TT	1(0,6)	0(0,0)		
58	rs2292181	hsa-mir-564	GG	144(90,0)	62(91,2)	1	0,7815 dom 0,87(0,33-2,33)
			CG	15(9,4)	6(8,8)		
			CC	1(0,6)	0(0,0)		
59	rs2292832	hsa-mir-149	FALLIDO				
60	rs2368392	hsa-mir-604	CC	83(52,2)	36(52,2)	1	0,6921 rec 0,81(0,28-2,34)
			CT	62(39,0)	28(40,6)		
			TT	14(8,8)	5(7,2)		
61	rs243080	hsa-mir-4432	CC	49(30,6)	21(30,9)	1	0,06288 rec 1,88(0,97-3,64)
			CT	82(51,2)	27(39,7)		
			TT	29(18,1)	20(29,4)		
62	rs257095	hsa-mir-4636	AA	124(77,5)	55(80,9)	1	0,3288 rec 0,38(0,05-3,24)
			AG	30(18,8)	12(17,6)		
			GG	6(3,8)	1(1,5)		
63	rs2648841	hsa-mir-1208	CC	120(75,5)	54(79,4)	1	0,5168 dom 0,80(0,40-1,59)
			AC	36(22,6)	12(17,6)		
			AA	3(1,9)	2(2,9)		
64	rs2663345	hsa-mir-3183	FALLIDO				
65	rs266435	hsa-mir-4804	CC	123(77,4)	52(76,5)	1	0,5520 rec 2,36(0,15-38,26)
			CG	35(22,0)	15(22,1)		
			GG	1(0,6)	1(1,5)		

Tabla anexa 7. Resultados de SNPs en miRNAs en la población española (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%control)	N(%casos)	OR (95%IC)	P
66	rs2682818	hsa-mir-618	CC	121(75,6)	55(79,7)	0,79(0,43-1,46)	0,4538 log
			AC	35(21,9)	13(18,8)		
			AA	4(2,5)	1(1,4)		
67	rs28477407	hsa-mir-4308	CC	134(83,8)	58(84,1)	1 0,0(0-)	0,08986 rec
			CT	26(16,2)	9(13,0)		
			TT	0(0,0)	2(2,9)		
68	rs28645567	hsa-mir-378d-1	GG	152(95,6)	68(98,6)	1 0,32(0,04-2,65)	0,2283 cod
			AG	7(4,4)	1(1,4)		
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
69	rs28655823	hsa-mir-4472-1	GG	111(77,6)	51(73,9)	1,20(0,68-2,14)	0,5327 log
			CG	29(20,3)	16(23,2)		
			CC	3(2,1)	2(2,9)		
70	rs28664200	hsa-mir-1255a	TT	86(55,5)	2(15,4)	4,28(1,70-10,80)	0,001354 log
			CT	62(40,0)	8(61,5)		
			CC	7(4,5)	3(23,1)		
71	rs2910164	hsa-mir-146a	GG	84(52,5)	46(66,7)	1 0,55(0,31-1,00)	0,04534 dom
			CG	66(41,2)	18(26,1)		
			CC	10(6,2)	5(7,2)		
72	rs2967897	hsa-mir-5695	MONOMORFICO				
73	rs3112399	hsa-mir-4803	TT	52(32,5)	15(22,1)	1 2,09(1,04-4,22) 1,16(0,51-2,62)	0,06815 cod
			AT	63(39,4)	38(55,9)		
			AA	45(28,1)	15(22,1)		
74	rs34115976	hsa-mir-577	CC	109(68,1)	51(73,9)	0,79(0,48-1,31)	0,3555 log
			CG	41(25,6)	15(21,7)		
			GG	10(6,2)	3(4,3)		
75	rs35196866	hsa-mir-4669	FALLIDO				
76	rs356125	hsa-mir-2278	GG	140(87,5)	68(98,6)	1 0,1(0,01-0,78)	0,002244 cod
			AG	20(12,5)	1(1,4)		
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
77	rs35613341	hsa-mir-5189	CC	72(45,0)	38(56,7)	1 0,62(0,35-1,11)	0,1069
			CG	57(35,6)	17(25,4)		
			GG	31(19,4)	12(17,9)		
78	rs35650931	hsa-mir-6076	GG	132(82,5)	58(84,1)	1 0,00(0,00-)	0,5557 rec
			CG	25(15,6)	11(15,9)		
			CC	3(1,9)	0(0,0)		
79	rs35770269	hsa-mir-449c	AA	61(38,4)	35(50,7)	0,64(0,42-0,98)	0,03816 log
			AT	71(44,7)	28(40,6)		
			TT	27(17,0)	6(8,7)		
80	rs35854553	hsa-mir-3166	AA	136(85,5)	16(84,2)	1 4,36(0,38-50,51)	0,2867 rec
			AT	21(13,2)	2(10,5)		
			TT	2(1,3)	1(5,3)		
81	rs367805	hsa-mir-3936	GG	76(47,8)	37(56,1)	1 0,72(0,40-1,28)	0,2587 dom
			AG	67(42,1)	21(31,8)		
			AA	16(10,1)	8(12,1)		
82	rs3734050	hsa-mir-6499	CC	147(91,9)	60(89,6)	1 1,32(0,5-3,47)	0,5789 cod
			CT	13(8,1)	7(10,4)		
			TT	0(0,0)	0(0,0)		
83	rs3746444	hsa-mir-499a	TT	106(66,2)	47(68,1)	0,91(0,54-1,54)	0,7304 log
			CT	48(30,0)	20(29,0)		
			CC	6(3,8)	2(2,9)		
84	rs3823658	hsa-mir-5090	GG	112(70,0)	52(75,4)	1 4,75(0,42-53,24)	0,1895 rec
			AG	47(29,4)	15(21,7)		
			AA	1(0,6)	2(2,9)		

Tabla anexa 7. Resultados de SNPs en miRNAs en la población española (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%control)	N(%casos)	OR (95%IC)	P	
85	rs4112253	hsa-mir-4751	CC	60(37,5)	34(49,3)	0,65(0,42-1,01)	0,05378 log	
			CG	78(48,8)	30(43,5)			
			GG	22(13,8)	5(7,2)			
86	rs41274239	hsa-mir-96	AA	159(99,4)	69(100,0)	1	1	
			AG	1(0,6)	0(0,0)	0(0)		
			GG	0(0,0)	0(0,0)			
87	rs41274312	hsa-mir-187	GG	157(98,7)	68(98,6)	1	0,9081 cod	
			AG	2(1,3)	1(1,4)	1,15(0,1-12,95)		
			AA	0(0,0)	0(0,0)			
88	rs41286570	hsa-mir-154	MONOMORFICO					
89	rs41291179	hsa-mir-216a	AA	140(87,5)	65(94,2)	1	0,1102 cod	
			AT	20(12,5)	4(5,8)	0,43(0,14-1,31)		
			TT	0(0,0)	0(0,0)			
90	rs41292412	hsa-mir-122	CC	159(99,4)	69(100,0)	1	1	
			CT	1(0,6)	0(0,0)	00		
			TT	0(0,0)	0(0,0)			
91	rs4285314	hsa-mir-3135b	FALLIDO					
92	rs4414449	hsa-mir-548ap	TT	36(43,4)	24(37,5)	1	0,4719 dom	
			CT	32(38,6)	29(45,3)	1,28(0,66-2,49)		
			CC	15(18,1)	11(17,2)			
93	rs45530340	hsa-mir-6084	MONOMORFICO					
94	rs4577031	hsa-mir-548ap	AA	62(38,8)	26(37,7)	1	0,7609 rec	
			AT	75(46,9)	32(46,4)	1,13(0,52-2,47)		
			TT	23(14,4)	11(15,9)			
95	rs4674470	hsa-mir-4268	TT	101(63,5)	50(72,5)	1	0,05824 rec	
			CT	47(29,6)	18(26,1)	0,20(0,03-1,56)		
			CC	11(6,9)	1(1,4)			
96	rs4809383	hsa-mir-941-1	CC	119(75,3)	13(72,2)	1	0,1023 rec	
			CT	39(24,7)	4(22,2)	0,00(-)		
			TT	0(0,0)	1(5,6)			
97	rs4822739	hsa-mir-548j	CC	143(89,4)	61(88,4)	1	0,83	
			CG	17(10,6)	8(11,6)	1,1(0,45-2,69)		
			GG	0(0,0)	0(0,0)			
98	rs487571	hsa-mir-5680	FALLIDO					
99	rs4909237	hsa-mir-595	CC	103(64,4)	46(66,7)	1	0,3858 cod	
			CT	53(33,1)	19(27,5)	0,80(0,43-1,51)		
			TT	4(2,5)	4(5,8)	2,24(0,54-9,35)		
100	rs4919510	hsa-mir-608	CC	103(64,4)	46(67,6)	1	0,6337 dom	
			CG	52(32,5)	20(29,4)	0,86(0,47-1,58)		
			GG	5(3,1)	2(2,9)			
101	rs515924	hsa-mir-548al	AA	132(83,0)	51(73,9)			
			AG	27(17,0)	18(26,1)			
			GG	0(0,0)	0(0,0)			
102	rs521188	hsa-mir-3671	AA	149(93,1)	61(88,4)			
			AG	11(6,9)	8(11,6)			
			GG	0(0,0)	0(0,0)			
103	rs56088671	hsa-mir-4424	FALLIDO					
104	rs56103835	hsa-mir-323b	TT	115(71,9)	42(60,9)	1	0,10324 dom	
			CT	39(24,4)	25(36,2)	1,64(0,91-2,97)		
			CC	6(3,8)	2(2,9)			
105	rs56195815	hsa-mir-548aw	FALLIDO					

Tabla anexa 7. Resultados de SNPs en miRNAs en la población española (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%control)	N(%casos)	OR (95%IC)	P
106	rs56292801	hsa-mir-5189	GG	43(51,8)	39(58,2)	0,81(0,52-1,26)	0,3433 log
			AG	26(31,3)	20(29,9)		
			AA	14(16,9)	8(11,9)		
107	rs57111412	hsa-mir-1283-1	FALLIDO				
108	rs58450758	hsa-mir-559	FALLIDO				
109	rs58834075	hsa-mir-656	CC	157(98,1)	63(91,3)		
			CT	3(1,9)	6(8,7)		
			TT	0(0,0)	0(0,0)		
110	rs5965660	hsa-mir-888	FALLIDO				
111	rs5997893	hsa-mir-3928	GG	80(50,0)	32(46,4)	1	0,3349 rec
			AG	64(40,0)	27(39,1)	1,53(0,65-3,56)	
			AA	16(10,0)	10(14,5)		
112	rs60308683	hsa-mir-4762	FALLIDO				
113	rs6062431	hsa-mir-4326	GG	70(44,0)	36(52,9)	0,74(0,50-1,11)	0,1435 log
			CG	60(37,7)	24(35,3)		
			CC	29(18,2)	8(11,8)		
114	rs60871950	hsa-mir-4467	GG	35(22,0)	27(39,1)	1	0,008803 dom
			AG	83(52,2)	23(33,3)	0,44(0,24-0,81)	
			AA	41(25,8)	19(27,5)		
115	rs61388742	hsa-mir-596	TT	126(78,8)	57(82,6)	1	0,4992 cod
			CT	34(21,2)	12(17,4)	0,78(0,38-1,62)	
			CC	0(0,0)	0(0,0)		
116	rs61938575	hsa-mir-3922	GG	78(48,8)	8(47,1)	1	0,4925 rec
			AG	71(44,4)	7(41,2)	1,81(0,37-8,92)	
			AA	11(6,9)	2(11,8)		
117	rs61992671	hsa-mir-412	GG	57(35,6)	13(20,0)	1	0,01850 dom
			AG	66(41,2)	35(53,8)	2,21(1,11-4,41)	
			AA	37(23,1)	17(26,2)		
118	rs62154973	hsa-mir-4772	CC	131(81,9)	58(85,3)	1	0,5257 dom
			CT	26(16,2)	10(14,7)	0,78(0,36-1,70)	
			TT	3(1,9)	0(0,0)		
119	rs62376935	hsa-mir-585	CC	147(91,9)	62(91,2)	1	0,2982 rec
			CT	13(8,1)	5(7,4)	0,0(0-)	
			TT	0(0,0)	1(1,5)		
120	rs641071	hsa-mir-4482	FALLIDO				
121	rs6430498	hsa-mir-3679	GG	70(44,0)	22(32,4)	1	0,09805 dom
			AG	70(44,0)	37(54,4)	1,64(0,91-2,99)	
			AA	19(11,9)	9(13,2)		
122	rs6505162	hsa-mir-423	FALLIDO				
123	rs6513496	hsa-mir-646	TT	102(63,8)	45(66,2)	1	0,1091rec
			CT	50(31,2)	23(33,8)	0,00(0,00-)	
			CC	8(5,0)	0(0,0)		
124	rs66507245	hsa-mir-4731	FALLIDO				
125	rs66683138	hsa-mir-3622a	FALLIDO				
126	rs67042258	hsa-mir-6128	GG	89(56)	47(69,1)	1	0,06157dom
			AG	62(39)	16(23,5)	0,57(0,31-1,04)	
			AA	8(5)	5(7,4)		
127	rs670637	hsa-mir-3167	MONOMORFICO				

Tabla anexa 7. Resultados de SNPs en miRNAs en la población española (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P
128	rs67182313	hsa-mir-4642	AA	111(69,4)	48(71,6)	1	0,6245rec
			AG	45(28,1)	18(26,9)	0,59(0,06-5,39)	
			GG	4(2,5)	1(1,5)		
129	rs6726779	hsa-mir-4431	TT	68(42,5)	24(34,8)	1,26(0,84-1,89)	0,2594 log
			CT	70(43,8)	33(47,8)		
			CC	22(13,8)	12(17,4)		
130	rs67339585	MIR3910-1, MIR3910-2	FALLIDO				
131	rs6787734	hsa-mir-3135a	FALLIDO				
132	rs67976778	hsa-mir-4305	FALLIDO				
133	rs68035463	hsa-mir-3144	CC	106(66,7)	41(59,4)	1,35(0,83-2,21)	0,2280 log
			AC	48(30,2)	24(34,8)		
			AA	5(3,1)	4(5,8)		
134	rs6841938	hsa-mir-1255b-1	FALLIDO				
135	rs6977967	hsa-mir-3683	AA	100(62,5)	36(52,2)	1,48(0,92-2,37)	0,1054log
			AG	54(33,8)	28(40,6)		
			GG	6(3,8)	5(7,2)		
136	rs6997249	hsa-mir-3686	FALLIDO				
137	rs701213	hsa-mir-4427	FALLIDO				
138	rs702742	hsa-mir-378h	AA	117(73,1)	58(86,6)	1	0,02243 dom
			AG	41(25,6)	8(11,9)	0,42(0,19-0,93)	
			GG	2(1,2)	1(1,5)		
139	rs7070684	hsa-mir-548aj-2	FALLIDO				
140	rs71363366	hsa-mir-1283-2	CC	154(96,2)	62(89,9)	1	0,06666 cod
			CG	6(3,8)	7(10,1)	2,9(0,94-8,97)	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
141	rs7205289	hsa-mir-140	MONOMORFICO				
142	rs7207008	hsa-mir-2117	TT	54(33,8)	19(27,5)	1	0,09057rec
			AT	78(48,8)	31(44,9)	1,79(0,92-3,49)	
			AA	28(17,5)	19(27,5)		
143	rs7227168	hsa-mir-4741	CC	126(79,2)	52(76,5)	1	0,1599 rec
			CT	31(19,5)	13(19,1)	3,62(0,59-22,19)	
			TT	2(1,3)	3(4,4)		
144	rs7247237	hsa-mir-3188	CC	72(45,3)	23(34,3)	1	0,004491rec
			CT	77(48,4)	31(46,3)	3,59(1,49-8,66)	
			TT	10(6,3)	13(19,4)		
145	rs72502717	hsa-mir-3689f	FALLIDO				
146	rs72631816	hsa-mir-105-2	FALLIDO				
147	rs72631825	hsa-mir-222	FALLIDO				
148	rs72631826	hsa-mir-16-1	MONOMORFICO				
149	rs72631827	hsa-mir-106b	MONOMORFICO				
150	rs72631831	hsa-mir-323b	MONOMORFICO				
151	rs72631833	hsa-mir-183	MONOMORFICO				
152	rs72646786	hsa-mir-3972	CC	126(78,8)	55(79,7)	1	0,8696dom
			CT	32(20,0)	14(20,3)	0,94(0,47-1,90)	
			TT	2(1,2)	0(0,0)		
153	rs72855836	hsa-mir-3976	GG	146(91,2)	61(88,4)	1	0,5094codom
			AG	14(8,8)	8(11,6)	1,37(0,55-3,43)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
154	rs72996752	hsa-mir-4999	AA	102(63,8)	40(60,6)	1	0,2423rec
			AG	52(32,5)	21(31,8)	2,10(0,62-7,15)	
			GG	6(3,8)	5(7,6)		

Tabla anexa 7. Resultados de SNPs en miRNAs en la población española (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P
155	rs73112689	hsa-mir-4459	FALLIDO				
156	rs7311975	hsa-mir-1178	TT	152(95,0)	65(94,2)	1	0,8056codom
			CT	8(5,0)	4(5,8)	1,17(0,34-4,02)	
			CC	0(0,0)	0(0,0)		
157	rs73147065	hsa-mir-647	FALLIDO				
158	rs73177830	hsa-mir-4532	FALLIDO				
159	rs73235381	hsa-mir-548h-4	FALLIDO				
160	rs73239138	hsa-mir-1269a	GG	94(59,5)	43(62,3)	0,89(0,55-1,44)	0,6249log
			AG	55(34,8)	23(33,3)		
			AA	9(5,7)	3(4,3)		
161	rs73410309	hsa-mir-4739	FALLIDO				
162	rs74428911	hsa-mir-4474	GG	158(98,8)	68(98,6)	1	0,904codom
			GT	2(1,2)	1(1,4)	1,16(0,1-13,03)	
			TT	0(0,0)	0(0,0)		
163	rs74469188	hsa-mir-6504	TT	122(76,2)	13(72,2)	1	0,7090dom
			CT	36(22,5)	5(27,8)	1,23(0,41-3,69)	
			CC	2(1,2)	0(0,0)		
164	rs745666	hsa-mir-3615	CC	61(38,1)	21(30,4)	1	0,2619dom
			CG	74(46,2)	39(56,5)	1,41(0,77-2,58)	
			GG	25(15,6)	9(13,0)		
165	rs74704964	hsa-mir-518d	CC	154(97,5)	18(100,0)	1	1
			CT	4(2,5)	0(0,0)	0(0-)	
			TT	0(0,0)	0(0,0)		
166	rs74904371	hsa-mir-2682	CC	152(95,0)	65(94,2)	1	0,8056dom
			CT	7(4,4)	4(5,8)	1,17(0,34-4,02)	
			TT	1(0,6)	0(0,0)		
167	rs74949342	hsa-mir-5702	CC	158(98,8)	69(100,0)	1	1
			CG	2(1,2)	0(0,0)	0(0-)	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
168	rs7500280	hsa-mir-4719	FALLIDO				
169	rs75019967	hsa-mir-4477a	MONOMORFICO				
170	rs7522956	hsa-mir-4742	AA	94(58,8)	38(55,1)	1	0,6058dom
			AC	59(36,9)	28(40,6)	1,16(0,66-2,05)	
			CC	7(4,4)	3(4,3)		
171	rs75598818	hsa-mir-520f	GG	155(96,9)	64(92,8)	1	0,1791 codom
			AG	5(3,1)	5(7,2)	2,42(0,68-8,65)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
172	rs75715827	hsa-mir-944	TT	132(82,5)	62(89,9)	1	0,1426dom
			CT	26(16,2)	7(10,1)	0,53(0,22-1,29)	
			CC	2(1,2)	0(0,0)		
173	rs75966923	hsa-mir-4298	CC	149(93,1)	67(97,1)	1	0,2053codom
			AC	11(6,9)	2(2,9)	0,4(0,09-1,87)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
174	rs76481776	hsa-mir-182	CC	134(83,8)	56(81,2)	1,04(0,53-2,03)	0,4689log
			CT	23(14,4)	13(18,8)		
			TT	3(1,9)	0(0,0)		
175	rs76800617	hsa-mir-4521	AA	152(95,0)	66(95,7)	1	0,8308codom
			AG	8(5,0)	3(4,3)	0,86(0,22-3,36)	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
176	rs77055126	hsa-mir-1303	FALLIDO				
177	rs7709117	hsa-mir-4634	AA	48(30,2)	28(41,2)	0,71(0,48-1,04)	0,07559log
			AG	70(44,0)	28(41,2)		
			GG	41(25,8)	12(17,6)		

Tabla anexa 7. Resultados de SNPs en miRNAs en la población española (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%control)	N(%casos)	OR (95%IC)	P
178	rs77639117	hsa-mir-576	AA	156(97,5)	60(87,0)	1	0,002714codom
			AT	4(2,5)	9(13,0)	5,85(1,74-19,71)	
			TT	0(0,0)	0(0,0)		
179	rs78396863	hsa-mir-4743	GG	154(96,9)	66(95,7)	1	0,6563codom
			CG	5(3,1)	3(4,3)	1,4(0,33-6,03)	
			CC	0(0,0)	0(0,0)		
180	rs78541299	hsa-mir-6075	GG	158(98,8)	67(97,1)	1	0,4025 codom
			AG	2(1,2)	2(2,9)	2,36(0,33-17,09)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
181	rs78790512	hsa-mir-6083	GG	106(66,2)	46(66,7)	1	0,7432rec
			AG	48(30,0)	21(30,4)	0,77(0,15-3,89)	
			AA	6(3,8)	2(2,9)		
182	rs78831152	hsa-mir-4789	CC	133(83,1)	57(83,8)	1	0,8967dom
			CT	26(16,2)	11(16,2)	0,95(0,44-2,05)	
			TT	1(0,6)	0(0,0)		
183	rs78832554	hsa-mir-4786	GG	149(93,1)	63(91,3)	1	0,6343codom
			AG	11(6,9)	6(8,7)	1,29(0,46-3,64)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
184	rs7896283	hsa-mir-4481	AA	26(40,0)	3(37,5)	1	0,8912dom
			AG	30(46,2)	4(50,0)	1,11(0,24-5,05)	
			GG	9(13,8)	1(12,5)		
185	rs7911488	hsa-mir-1307	FALLIDO				
186	rs79397096	hsa-mir-597	GG	156(97,5)	68(98,6)	1	0,604codom
			AG	4(2,5)	1(1,4)	0,57(0,06-5,23)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
187	rs79512808	hsa-mir-3976	TT	157(98,1)	69(100,0)	1	0,5557codom
			GT	3(1,9)	0(0,0)	0(0-)	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
188	rs80128580	hsa-mir-5707	GG	151(94,4)	66(95,7)	1	0,6857 codom
			AG	9(5,6)	3(4,3)	0,76(0,2-2,91)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
189	rs8054514	hsa-mir-3176	TT	111(69,4)	44(63,8)	1,31(0,76-2,26)	0,3269log
			GT	47(29,4)	23(33,3)		
			GG	2(1,2)	2(2,9)		
190	rs8078913	hsa-mir-4520a	CC	47(29,6)	19(27,9)	1	0,4182rec
			CT	80(50,3)	32(47,1)	1,32(0,68-2,59)	
			TT	32(20,1)	17(25,0)		
191	rs832733	hsa-mir-4698	FALLIDO				
192	rs850108	hsa-mir-550a-3	FALLIDO				
193	rs8667	hsa-mir-4751	GG	49(33,1)	18(26,1)	1	0,21197codom
			AG	76(51,4)	44(63,8)	1,58(0,82-3,04)	
			AA	23(15,5)	7(10,1)	0,83(0,30-2,26)	
194	rs877722	hsa-mir-4671	AA	115(71,9)	53(76,8)	1	0,3258rec
			AT	40(25,0)	16(23,2)	0,0(0 0,0-0)	
			TT	5(3,1)	0(0,0)		
195	rs895819	mir-27a	FALLIDO				
196	rs897984	hsa-mir-4519	FALLIDO				
197	rs9295535	hsa-mir-5689	FALLIDO				
198	rs936581	hsa-mir-3141	GG	116(72,5)	43(62,3)	1,50(0,90-2,50)	0,1229log
			AG	40(25,0)	23(33,3)		
			AA	4(2,5)	3(4,3)		
199	rs9842591	hsa-mir-5186	CC	43(26,9)	6(31,6)	1	0,6678dom
			AC	79(49,4)	9(47,4)	0,80(0,28-2,23)	
			AA	38(23,8)	4(21,1)		

Tabla anexa 7. Resultados de SNPs en miRNAs en la población española.

	SNP	Gen	Genotipo	N(%control)	N(%casos)	OR (95%IC)	P
200	rs9877402	hsa-mir-5680	AA	145(91,8)	15(83,3)	2,70(0,85-8,51)	0,07494log
			AG	13(8,2)	2(11,1)		
			GG	0(0,0)	1(5,6)		
201	rs9913045	hsa-mir-548h-3	FALLIDO				
202	seq_rs11048315	MIR4302	GG	122(76,2)	48(69,6)	1	0,07354codom
			AG	32(20,0)	21(30,4)	1,67(0,88-3,18)	
			AA	6(3,8)	0(0,0)	0,00(0,00-)	
203	seq_rs111803974	MIR3908	FALLIDO				
204	seq_rs111906529	MIR299, MIR380	TT	156(97,5)	66(95,7)	1	0,4698codom
			CT	4(2,5)	3(4,3)	1,77(0,39-8,14)	
			CC	0(0,0)	0(0,0)		
205	seq_rs112328520	MIR520G	CC	135(84,9)	57(85,1)	1	0,9741codom
			CT	24(15,1)	10(14,9)	0,99(0,44-2,2)	
			TT	0(0,0)	0(0,0)		
206	seq_rs11269	mir-1282	MONOMORFICO				
207	seq_rs113808830	MIR4532	CC	130(81,2)	56(83,6)	1	0,5570rec
			CT	27(16,9)	11(16,4)	0,00(0,00-)	
			TT	3(1,9)	0(0,0)		
208	seq_rs116932476	hsa-mir-4479	GG	158(98,8)	67(98,5)	1	0,8947codom
			AG	2(1,2)	1(1,5)	1,18(0,11-13,23)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
209	seq_rs117258475	MIR296	GG	155(97,5)	68(98,6)	1	0,5996codom
			AG	4(2,5)	1(1,4)	0,57(0,06-5,19)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
210	seq_rs117650137	hsa-mir-6717	GG	152(95,0)	64(92,8)	1	0,5093codom
			AG	8(5,0)	5(7,2)	1,48(0,47-4,71)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
211	seq_rs117723462	MIR3649	MONOMORFICO				
212	seq_rs163642	MIR4436B2	FALLIDO				
213	seq_rs62571442	MIR3689	AA	55(35,3)	27(39,7)	0,85(0,56-1,28)	0,4316log
			AG	75(48,1)	32(47,1)		
			GG	26(16,7)	9(13,2)		

Tabla anexa 8. Resultados de SNPs en miRNAs en la población eslovena (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P
1	rs10061133	hsa-mir-449b	AA	77(80,2)	20(83,3)	1	0,7244 codom
			AG	19(19,8)	4(16,7)	0,81(0,25-2,65)	
			GG				
2	rs10173558	mir-1302-4	TT	74(77,1)	20(83,3)	1	0,4961 dom
			CT	21(21,9)	4(16,7)	0,67(0,21-2,18)	
			CC	1(1,0)	0(0,0)		
3	rs10406069	hsa-mir-5196	GG	61(63,5)	14(63,6)	1	0,5394 rec
			AG	33(34,4)	7(31,8)	2,24(0,19-25,85)	
			AA	2(2,1)	1(4,5)		
4	rs10422347	hsa-mir-4745	CC	80(83,3)	17(73,9)	1	0,3122 dom
			CT	15(15,6)	6(26,1)	1,76(0,60-5,17)	
			TT	1(1,0)	0(0,0)		
5	rs10461441	hsa-mir-548ae-2	FALLIDO				
6	rs10505168	hsa-mir-2053	AA	45(46,9)	11(55,0)	1	0,4723 rec
			AG	42(43,8)	6(30,0)	1,71(0,42-6,96)	
			GG	9(9,4)	3(15,0)		
7	rs1055070	hsa-mir-4700	TT	89(92,7)	21(95,5)	1	0,6285
			GT	7(7,3)	1(4,5)	0,61(0,07-5,19)	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
8	rs1077020	hsa-mir-943	FALLIDO				
9	rs10878362	hsa-mir-6074	FALLIDO				
10	rs10934682	hsa-mir-544b	TT	67(69,8)	16(69,6)	1	0,4045 rec
			GT	25(26,0)	5(21,7)	2,19(0,38-12,76)	
			GG	4(4,2)	2(8,7)		
11	rs11014002	hsa-mir-603	FALLIDO				
12	rs11032942	hsa-mir-1343	FALLIDO				
13	rs11156654	mir-624	TT	47(49,5)	10(45,5)	1	0,7323 rec
			AT	37(38,9)	10(45,5)	0,76(0,16-3,72)	
			AA	11(11,6)	2(9,1)		
14	rs11237828	hsa-mir-5579	FALLIDO				
15	rs11259096	hsa-mir-1265	TT	85(89,5)	20(87,0)	1	0,7342 codom
			CT	10(10,5)	3(13,0)	1,28(0,32-5,06)	
			CC	0(0,0)	0(0,0)		
16	rs11614913	hsa-mir-196a-2	CC	44(45,8)	7(30,4)	1	0,1740 dom
			CT	42(43,8)	13(56,5)	1,93(0,73-5,13)	
			TT	10(10,4)	3(13,0)		
17	rs11651671	hsa-mir-548at	FALLIDO				
18	rs11713052	hsa-mir-5092	CC	91(94,8)	21(95,5)	1	0,897 codom
			CG	5(5,2)	1(4,5)	0,87(0,1-7,81)	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
19	rs11714172	hsa-mir-4792	TT	50(52,1)	8(36,4)	1	0,1809 dom
			GT	37(38,5)	10(45,5)	1,90(0,73-4,95)	
			GG	9(9,4)	4(18,2)		
20	rs11907020	hsa-mir-3192	MONOMORFICO				
21	rs11983381	hsa-mir-4653	AA	63(65,6)	15(62,5)	1	0,2939 rec
			AG	30(31,2)	7(29,2)	2,82(0,44-17,90)	
			GG	3(3,1)	2(8,3)		
22	rs12197631	hsa-mir-548a-1	FALLIDO				
23	rs12355840	hsa-mir-202	TT	75(78,9)	17(89,5)	1	0,2603 dom
			CT	15(15,8)	2(10,5)	0,44(0,09-2,07)	
			CC	5(5,3)	0(0,0)		
24	rs12402181	hsa-mir-202	GG	75(78,1)	18(81,8)	1	0,6981 dom
			AG	19(19,8)	4(18,2)	0,79(0,24-2,60)	
			AA	2(2,1)	0(0,0)		

Tabla anexa 8. Resultados de SNPs en miRNAs en la población eslovena (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P
25	rs12451747	hsa-mir-1269b	FALLIDO				
26	rs12456845	hsa-mir-4744	TT	89(92,7)	21(87,5)	1	0,4307 codom
			CT	7(7,3)	3(12,5)	1,82(0,43-7,62)	
			CC	0(0,0)	0(0,0)		
27	rs12473206	hsa-mir-4433	FALLIDO				
28	rs12512664	hsa-mir-4274	AA	29(30,2)	6(30,0)	1	0,2317 rec
			AG	47(49,0)	12(60,0)	0,42(0,09-1,97)	
			GG	20(20,8)	2(10,0)		
29	rs12523324	hsa-mir-4277	FALLIDO				
30	rs12780876	hsa-mir-4293	TT	28(29,2)	11(50,0)	1	0,06703 dom
			AT	54(56,2)	8(36,4)	0,41(0,16-1,06)	
			AA	14(14,6)	3(13,6)		
31	rs12803915	hsa-mir-612	GG	75(78,1)	15(68,2)	1,30(0,54-3,14)	0,3128 log
			AG	18(18,8)	7(31,8)		
			AA	3(3,1)	0(0,0)		
32	rs12879262	hsa-mir-4309	GG	77(80,2)	16(72,7)	1	0,4494 dom
			CG	18(18,8)	6(27,3)	1,52(0,52-4,40)	
			CC	1(1,0)	0(0,0)		
33	rs12894467	hsa-mir-300	CC	25(26,0)	7(29,2)	1	0,5025 rec
			CT	53(55,2)	11(45,8)	1,44(0,50-4,15)	
			TT	18(18,8)	6(25,0)		
34	rs13186787	hsa-mir-1294	FALLIDO				
35	rs13299349	hsa-mir-3152	GG	38(39,6)	9(42,9)	1	0,1730 rec
			AG	50(52,1)	8(38,1)	2,59(0,70-9,57)	
			AA	8(8,3)	4(19,0)		
36	rs1414273	hsa-mir-548ac	FALLIDO				
37	rs1439619	hsa-mir-3175	CC	21(21,9)	6(26,1)	1	0,6688 rec
			AC	41(42,7)	8(34,8)	1,26(0,44-3,60)	
			AA	34(35,4)	9(39,1)		
38	rs1572687	hsa-mir-5007	CC	22(22,9)	9(42,9)	1	0,07080 dom
			CT	56(58,3)	7(33,3)	0,40(0,15-1,06)	
			TT	18(18,8)	5(23,8)		
39	rs1683709	hsa-mir-3612	CC	64(66,7)	15(65,2)	1	0,7184 rec
			CT	26(27,1)	7(30,4)	0,68(0,08-5,96)	
			TT	6(6,2)	1(4,3)		
40	rs17022749	hsa-mir-5700	FALLIDO				
41	rs17091403	hsa-mir-2110	CC	82(85,4)	22(84,6)	1	0,3666 rec
			CT	13(13,5)	3(11,5)	3,80(0,23-62,90)	
			TT	1(1,0)	1(3,8)		
42	rs17111728	hsa-mir-4422	TT	77(80,2)	19(86,4)	0,91(0,29-2,84)	0,08807 log
			CT	19(19,8)	2(9,1)		
			CC	0(0,0)	1(4,5)		
43	rs174561	mir-1908	FALLIDO				
44	rs17737028	hsa-mir-3143	AA	94(97,9)	25(100,0)	1	1 codom
			AG	2(2,1)	0(0,0)	00	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
45	rs17759989	hsa-mir-633	AA	90(93,8)	22(100,0)	1	0,5919 codom
			AG	6(6,2)	0(0,0)	00	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
46	rs17797090	hsa-mir-3652	GG	83(86,5)	21(95,5)	1	0,1949 dom
			AG	12(12,5)	1(4,5)	0,30(0,04-2,46)	
			AA	1(1,0)	0(0,0)		
47	rs17885221	hsa-mir-4733	CC	94(97,9)	23(95,8)	1	0,5833 codom
			CT	2(2,1)	1(4,2)	2,04(0,18-23,52)	
			TT	0(0,0)	0(0,0)		

Tabla anexa 8. Resultados de SNPs en miRNAs en la población eslovena (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P
48	rs2042253	hsa-mir-5197	AA	52(54,7)	18(75,0)	1	0,0649 dom
			AG	39(41,1)	5(20,8)	0,40(0,15-1,10)	
			GG	4(4,2)	1(4,2)		
49	rs2043556	hsa-mir-605	AA	59(61,5)	17(77,3)	1	0,1506 dom
			AG	33(34,4)	4(18,2)	0,47(0,16-1,38)	
			GG	4(4,2)	1(4,5)		
50	rs2060455	hsa-mir-4511	FALLIDO				
51	rs2070960	hsa-mir-3620	CC	75(78,9)	21(87,5)	0,99(0,36-2,70)	0,007829 log
			CT	20(21,1)	1(4,2)		
			TT	0(0,0)	2(8,3)		
52	rs2114358	hsa-mir-1206	TT	33(34,7)	11(47,8)	1	0,2492 dom
			CT	47(49,5)	8(34,8)	0,58(0,23-1,46)	
			CC	15(15,8)	4(17,4)		
53	rs215383	hsa-mir-4494	GG	71(74,0)	20(76,9)	1	0,7562 dom
			AG	24(25,0)	6(23,1)	0,85(0,31-2,36)	
			AA	1(1,0)	0(0,0)		
54	rs2241347	hsa-mir-3130-1	FALLIDO				
55	rs2273626	hsa-mir-4707	CC	31(32,3)	2(8,7)	1	0,01317 dom
			AC	45(46,9)	15(65,2)	5,01(1,10-22,72)	
			AA	20(20,8)	6(26,1)		
56	rs2289030	hsa-mir-492	CC	81(84,4)	19(82,6)	1,05(0,34-3,26)	0,7989 log
			CG	14(14,6)	4(17,4)		
			GG	1(1,0)	0(0,0)		
57	rs2291418	hsa-mir-1229	CC	90(93,8)	26(100,0)	1	0,3397 codom
			CT	6(6,2)	0(0,0)	00	
			TT	0(0,0)	0(0,0)		
58	rs2292181	hsa-mir-564	GG	85(88,5)	22(88,0)	1	1,05(0,27-4,11)
			CG	11(11,5)	3(12,0)		
			CC	0(0,0)	0(0,0)		
59	rs2292832	hsa-mir-149	FALLIDO				
60	rs2368392	hsa-mir-604	CC	47(49,0)	14(58,3)	1	0,3737 codom
			CT	42(43,8)	7(29,2)	0,56(0,21-1,52)	
			TT	7(7,3)	3(12,5)	1,44(0,33-6,31)	
61	rs243080	hsa-mir-4432	CC	30(31,6)	12(57,1)	1	0,03033 dom
			CT	49(51,6)	5(23,8)	0,35(0,13-0,91)	
			TT	16(16,8)	4(19,0)		
62	rs257095	hsa-mir-4636	AA	67(69,8)	19(79,2)	1	0,3506 dom
			AG	26(27,1)	4(16,7)	0,61(0,21-1,79)	
			GG	3(3,1)	1(4,2)		
63	rs2648841	hsa-mir-1208	CC	79(83,2)	21(84,0)	1	0,9196 codom
			AC	16(16,8)	4(16,0)	0,94(0,28-3,11)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
64	rs2663345	hsa-mir-3183	FALLIDO				
65	rs266435	hsa-mir-4804	CC	74(77,1)	17(77,3)	1	0,1864 rec
			CG	22(22,9)	4(18,2)	0	
			GG	0(0,0)	1(4,5)		
66	rs2682818	hsa-mir-618	CC	74(77,9)	15(75,0)	1	0,7805 codom
			AC	21(22,1)	5(25,0)	1,17(0,38-3,61)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
67	rs28477407	hsa-mir-4308	CC	79(82,3)	23(92,0)	1	0,2049 dom
			CT	16(16,7)	2(8,0)	0,40(0,09-1,88)	
			TT	1(1,0)	0(0,0)		
68	rs28645567	hsa-mir-378d-1	GG	92(95,8)	21(91,3)	1	0,4045 codom
			AG	4(4,2)	2(8,7)	2,19(0,38-12,76)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		

Tabla anexa 8. Resultados de SNPs en miRNAs en la población eslovena (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P
69	rs28655823	hsa-mir-4472-1	GG	58(69,9)	18(81,8)	1	0,2501 dom
			CG	23(27,7)	3(13,6)	0,52(0,16-1,68)	
			CC	2(2,4)	1(4,5)		
70	rs28664200	hsa-mir-1255a	TT	51(53,1)	11(55,0)	1	0,4428 rec
			CT	40(41,7)	7(35,0)	2,02(0,36-11,25)	
			CC	5(5,2)	2(10,0)		
71	rs2910164	hsa-mir-146a	GG	60(62,5)	18(75,0)	1	0,2410 dom
			CG	30(31,2)	5(20,8)	0,56(0,20-1,53)	
			CC	6(6,2)	1(4,2)		
72	rs2967897	hsa-mir-5695	MONOMORFICO				
73	rs3112399	hsa-mir-4803	TT	52(32,5)	15(22,1)	1	0,06815 codom
			AT	63(39,4)	38(55,9)	2,09(1,04-4,22)	
			AA	45(28,1)	15(22,1)	1,16(0,51-2,62)	
74	rs34115976	hsa-mir-577	CC	109(68,1)	51(73,9)	0,79(0,48-1,31)	0,3555 log
			CG	41(25,6)	15(21,7)		
			GG	10(6,2)	3(4,3)		
75	rs35196866	hsa-mir-4669	FALLIDO				
76	rs356125	hsa-mir-2278	GG	140(87,5)	68(98,6)	1	0,002244 codom
			AG	20(12,5)	1(1,4)	0,1(0,01-0,78)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
77	rs35613341	hsa-mir-5189	CC	72(45,0)	38(56,7)	1	0,1069 dom
			CG	57(35,6)	17(25,4)	0,62(0,35-1,11)	
			GG	31(19,4)	12(17,9)		
78	rs35650931	hsa-mir-6076	GG	132(82,5)	58(84,1)	1	0,5557 rec
			CG	25(15,6)	11(15,9)	0,00(0,00-)	
			CC	3(1,9)	0(0,0)		
79	rs35770269	hsa-mir-449c	AA	61(38,4)	35(50,7)	0,64(0,42-0,98)	0,03816 log
			AT	71(44,7)	28(40,6)		
			TT	27(17,0)	6(8,7)		
80	rs35854553	hsa-mir-3166	AA	86(89,6)	23(95,8)	1	0,3029 codom
			AT	10(10,4)	1(4,2)	0,37(0,05-3,07)	
			TT	0(0,0)	0(0,0)		
81	rs367805	hsa-mir-3936	GG	42(43,8)	10(45,5)	0,95(0,49-1,84)	0,8733 log
			AG	40(41,7)	9(40,9)		
			AA	14(14,6)	3(13,6)		
82	rs3734050	hsa-mir-6499	CC	88(91,7)	19(82,6)	1	0,2235 codom
			CT	8(8,3)	4(17,4)	2,32(0,63-8,49)	
			TT	0(0,0)	0(0,0)		
83	rs3746444	hsa-mir-499a	TT	64(66,7)	18(75,0)	1	0,03098 codom
			CT	30(31,2)	3(12,5)	0,36(0,10-1,30)	
			CC	2(2,1)	3(12,5)	5,33(0,83-34,40)	
84	rs3823658	hsa-mir-5090	GG	74(77,1)	18(75)	0,96(0,38-2,40)	0,7911 log
			AG	19(19,8)	6(25)		
			AA	3(3,1)	0(0)		
85	rs4112253	hsa-mir-4751	CC	43(44,8)	12(63,2)	1	0,1419 dom
			CG	41(42,7)	5(26,3)	0,47(0,17-1,31)	
			GG	12(12,5)	2(10,5)		
86	rs41274239	hsa-mir-96	MONOMORFICO				
87	rs41274312	hsa-mir-187	GG	95(99,0)	22(95,7)	1	0,3259 codom
			AG	1(1,0)	1(4,3)	4,32(0,26-71,75)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
88	rs41286570	hsa-mir-154	MONOMORFICO				

Tabla anexa 8. Resultados de SNPs en miRNAs en la población eslovena (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P	
89	rs41291179	hsa-mir-216a	AA	90(93,8)	23(95,8)	1	0,6857 codom	
			AT	6(6,2)	1(4,2)	0,65(0,07-5,69)		
			TT	0(0,0)	0(0,0)			
90	rs41292412	hsa-mir-122	MONOMORFICO					
91	rs4285314	hsa-mir-3135b	FALLIDO					
92	rs4414449	hsa-mir-548ap	TT	24(27,6)	0(0,0)	1	1 codom	
			CT	43(49,4)	1(100,0)	0		
			CC	20(23,0)	0(0,0)			
93	rs45530340	hsa-mir-6084	MONOMORFICO					
94	rs4577031	hsa-mir-548ap	AA	26(27,1)	9(37,5)	0,62(0,31-1,24)	0,1664 log	
			AT	52(54,2)	13(54,2)			
			TT	18(18,8)	2(8,3)			
95	rs4674470	hsa-mir-4268	TT	50(52,1)	17(85,0)	1	0,0020791 codom	
			CT	40(41,7)	1(5,0)	0,07(0,01-0,58)		
			CC	6(6,2)	2(10,0)	0,98(0,18-5,33)		
96	rs4809383	hsa-mir-941-1	CC	73(76,8)	18(72,0)	1	0,6191 dom	
			CT	19(20,0)	6(24,0)	1,29(0,48-3,49)		
			TT	3(3,2)	1(4,0)			
97	rs4822739	hsa-mir-548j	CC	84(87,5)	23(95,8)	1	0,1962 codom	
			CG	12(12,5)	1(4,2)	0,3(0,04-2,46)		
			GG	0(0,0)	0(0,0)			
98	rs487571	hsa-mir-5680	FALLIDO					
99	rs4909237	hsa-mir-595	CC	74(77,1)	20(83,3)	1	0,4961 dom	
			CT	18(18,8)	4(16,7)	0,67(0,21-2,18)		
			TT	4(4,2)	0(0,0)			
100	rs4919510	hsa-mir-608	CC	68(70,8)	19(76,0)	1	0,6044 dom	
			CG	27(28,1)	6(24,0)	0,77(0,28-2,12)		
			GG	1(1,0)	0(0,0)			
101	rs515924	hsa-mir-548al	AA	74(77,1)	20(83,3)	1	0,06792 codom	
			AG	21(21,9)	(2)	0,35(0,08-1,63)		
			GG	1(1,0)	(2)	7,40(0,64-85,82)		
102	rs521188	hsa-mir-3671	AA	88(91,7)	24(100)	1	0,3551 codom	
			AG	8(8,3)	0(0,0)	00		
			GG	0(0,0)	0(0,0)			
103	rs56088671	hsa-mir-4424	FALLIDO					
104	rs56103835	hsa-mir-323b	TT	55(57,3)	15(65,2)	1	0,4847 dom	
			CT	39(40,6)	8(34,8)	0,72(0,28-1,85)		
			CC	2(2,1)	0(0,0)			
105	rs56195815	hsa-mir-548aw	FALLIDO					
106	rs56292801	hsa-mir-5189	GG	51(53,1)	18(81,8)	1	0,010167 dom	
			AG	41(42,7)	3(13,6)	0,25(0,08-0,80)		
			AA	4(4,2)	1(4,5)			
107	rs57111412	hsa-mir-1283-1	FALLIDO					
108	rs58450758	hsa-mir-559	FALLIDO					
109	rs58834075	hsa-mir-656	CC	88(91,7)	26(100,0)	1	0,2002 codom	
			CT	8(8,3)	0(0,0)	00		
			TT	0(0,0)	0(0,0)			
110	rs5965660	hsa-mir-888	FALLIDO					

Tabla anexa 8. Resultados de SNPs en miRNAs en la población eslovena (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P
111	rs5997893	hsa-mir-3928	GG	36(37,5)	5(20,8)	1	0,1118 dom
			AG	47(49,0)	14(58,3)	2,28(0,78-6,64)	
			AA	13(13,5)	5(20,8)		
112	rs60308683	hsa-mir-4762	FALLIDO				
113	rs6062431	hsa-mir-4326	GG	36(37,9)	10(40,0)	1	0,7314 rec
			CG	41(43,2)	11(44,0)	0,81(0,25-2,67)	
			CC	18(18,9)	(4)		
114	rs60871950	hsa-mir-4467	GG	43(44,8)	9(39,1)	1,24(0,67-2,30)	0,4899 log
			AG	38(39,6)	9(39,1)		
			AA	15(15,6)	5(21,7)		
115	rs61388742	hsa-mir-596	TT	79(82,3)	18(78,3)	1	0,5615 rec
			CT	15(15,6)	4(17,4)	2,14(0,19-24,63)	
			CC	2(2,1)	1(4,3)		
116	rs61938575	hsa-mir-3922	GG	48(50,5)	11(68,8)	1	0,1709 dom
			AG	41(43,2)	5(31,2)	0,46(0,15-1,44)	
			AA	6(6,3)	0(0,0)		
117	rs61992671	hsa-mir-412	GG	19(19,8)	5(22,7)	1,12(0,56-2,25)	0,7419 log
			AG	53(55,2)	12(54,5)		
			AA	24(25,0)	5(22,7)		
118	rs62154973	hsa-mir-4772	CC	69(71,9)	16(76,2)	1	0,6844 codom
			CT	27(28,1)	5(23,8)	0,8(0,27-2,4)	
			TT	0(0,0)	0(0,0)		
119	rs62376935	hsa-mir-585	CC	85(88,5)	23(100,0)	1	0,4135 codom
			CT	8(8,3)	0(0,0)	00	
			TT	3(3,1)	0(0,0)		
120	rs641071	hsa-mir-4482	FALLIDO				
121	rs6430498	hsa-mir-3679	GG	47(49,0)	11(47,8)	1,04(0,51-2,11)	0,9199 log
			AG	41(42,7)	10(43,5)		
			AA	8(8,3)	2(8,7)		
122	rs6505162	hsa-mir-423	FALLIDO				
123	rs6513496	hsa-mir-646	TT	63(65,6)	13(56,5)	1	0,2745 rec
			CT	30(31,2)	8(34,8)	2,95(0,46-18,79)	
			CC	3(3,1)	2(8,7)		
124	rs66507245	hsa-mir-4731	FALLIDO				
125	rs66683138	hsa-mir-3622a	FALLIDO				
126	rs67042258	hsa-mir-6128	GG	54(56,2)	12(54,5)	1	0,1430 rec
			AG	35(36,5)	6(27,3)	2,83(0,75-10,67)	
			AA	7(7,3)	4(18,2)		
127	rs670637	hsa-mir-3167	MONOMORFICO				
128	rs67182313	hsa-mir-4642	AA	65(67,7)	16(76,2)	1	0,4368 dom
			AG	28(29,2)	5(23,8)	0,66(0,22-1,95)	
			GG	3(3,1)	0(0,0)		
129	rs6726779	hsa-mir-4431	TT	34(35,8)	12(63,2)	1	0,02722 codom
			CT	51(53,7)	4(21,1)	0,22(0,07-0,75)	
			CC	10(10,5)	3(15,8)	0,85(0,20-3,62)	
130	rs67339585	MIR3910-1, MIR3910-2	FALLIDO				
131	rs6787734	hsa-mir-3135a	FALLIDO				
132	rs67976778	hsa-mir-4305	FALLIDO				
133	rs68035463	hsa-mir-3144	CC	61(63,5)	18(85,7)	1	0,03721 dom
			AC	31(32,3)	2(9,5)	0,29(0,08-1,06)	
			AA	4(4,2)	1(4,8)		

Tabla anexa 8. Resultados de SNPs en miRNAs en la población eslovena (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P
134	rs6841938	hsa-mir-1255b-1	FALLIDO				
135	rs6977967	hsa-mir-3683	AA	67(69,8)	13(59,1)	1	0,3399 dom
			AG	24(25,0)	8(36,4)	1,60(0,62-4,16)	
			GG	5(5,2)	1(4,5)		
136	rs6997249	hsa-mir-3686	FALLIDO				
137	rs701213	hsa-mir-4427	FALLIDO				
138	rs702742	hsa-mir-378h	AA	87(90,6)	19(79,2)	1	0,1421 dom
			AG	8(8,3)	5(20,8)	2,54(0,77-8,45)	
			GG	1(1,0)	0(0,0)		
139	rs7070684	hsa-mir-548aj-2	FALLIDO				
140	rs71363366	hsa-mir-1283-2	CC	84(89,4)	21(91,3)	0,77(92 cod-om)	
			CG	10(10,6)	2(8,7)		
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
141	rs7205289	hsa-mir-140	MONOMORFICO				
142	rs7207008	hsa-mir-2117	TT	29(30,2)	7(26,9)	1	0,5579 rec
			AT	43(44,8)	11(42,3)	1,33(0,51-3,46)	
			AA	24(25,0)	8(30,8)		
143	rs7227168	hsa-mir-4741	CC	68(70,8)	18(75)	1	0,6825 codom
			CT	28(29,2)	6(25)	0,81(0,29-2,25)	
			TT	0(0,0)	0(0,0)		
144	rs7247237	hsa-mir-3188	CC	43(45,3)	14(56,0)	0,66(0,31-1,40)	0,2726 log
			CT	44(46,3)	10(40,0)		
			TT	8(8,4)	1(4,0)		
145	rs72502717	hsa-mir-3689f	FALLIDO				
146	rs72631816	hsa-mir-105-2	FALLIDO				
147	rs72631825	hsa-mir-222	FALLIDO				
148	rs72631826	hsa-mir-16-1	MONOMORFICO				
149	rs72631827	hsa-mir-106b	MONOMORFICO				
150	rs72631831	hsa-mir-323b	MONOMORFICO				
151	rs72631833	hsa-mir-183	MONOMORFICO				
152	rs72646786	hsa-mir-3972	CC	70(72,9)	18(78,3)	1	0,3259 rec
			CT	25(26,0)	4(17,4)	4,32(0,26-71,75)	
			TT	1(1,0)	1(4,3)		
153	rs72855836	hsa-mir-3976	GG	86(89,6)	20(83,3)	1	0,4120 dom
			AG	8(8,3)	4(16,7)	1,72(0,49-6,05)	
			AA	2(2,1)	0(0,0)		
154	rs72996752	hsa-mir-4999	FALLIDO				
155	rs73112689	hsa-mir-4459	FALLIDO				
156	rs7311975	hsa-mir-1178	TT	85(88,5)	22(95,7)	1	0,2672 dom
			CT	10(10,4)	1(4,3)	0,35(0,04-2,87)	
			CC	1(1,0)	0(0,0)		
157	rs73147065	hsa-mir-647	FALLIDO				
158	rs73177830	hsa-mir-4532	FALLIDO				
159	rs73235381	hsa-mir-548h-4	FALLIDO				
160	rs73239138	hsa-mir-1269a	GG	50(52,1)	14(66,7)	1	0,2192 dom
			AG	38(39,6)	6(28,6)	0,54(0,20-1,47)	
			AA	8(8,3)	1(4,8)		
161	rs73410309	hsa-mir-4739	FALLIDO				
162	rs74428911	hsa-mir-4474	GG	94(97,9)	25(100,0)	1	1 codom
			GT	2(2,1)	0(0,0)	00	
			TT	0(0,0)	0(0,0)		
163	rs74469188	hsa-mir-6504	TT	78(82,1)	17(77,3)	1	0,6079 dom
			CT	16(16,8)	5(22,7)	1,35(0,44-4,16)	
			CC	1(1,1)	0(0,0)		

Tabla anexa 8. Resultados de SNPs en miRNAs en la población eslovena (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P
164	rs745666	hsa-mir-3615	CC	40(41,7)	12(48,0)	1	0,5699 dom
			CG	39(40,6)	9(36,0)	0,77(0,32-1,87)	
			GG	17(17,7)	4(16,0)		
165	rs74704964	hsa-mir-518d	CC	84(88,4)	22(91,7)	1	0,6392 codom
			CT	11(11,6)	2(8,3)	0,69(0,14-3,36)	
			TT	0(0,0)	0(0,0)		
166	rs74904371	hsa-mir-2682	CC	90(93,8)	23(92,0)	1	0,759 codom
			CT	6(6,2)	2(8,0)	1,3(0,25-6,89)	
			TT	0(0,0)	0(0,0)		
167	rs74949342	hsa-mir-5702	MONOMORFICO				
168	rs7500280	hsa-mir-4719	FALLIDO				
169	rs75019967	hsa-mir-4477a	MONOMORFICO				
170	rs7522956	hsa-mir-4742	AA	53(55,2)	15(68,2)	1	0,2609 dom
			AC	40(41,7)	6(27,3)	0,58(0,22-1,54)	
			CC	3(3,1)	1(4,5)		
171	rs75598818	hsa-mir-520f	GG	88(91,7)	23(100,0)	1	0,3514 codom
			AG	8(8,3)	0(0,0)	00	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
172	rs75715827	hsa-mir-944	TT	85(88,5)	18(90,0)	1	0,8489 dom
			CT	9(9,4)	2(10,0)	0,86(0,18-4,21)	
			CC	2(2,1)	0(0,0)		
173	rs75966923	hsa-mir-4298	CC	89(92,7)	23(92,0)	1	0,9051 codom
			AC	7(7,3)	2(8,0)	1,11(0,22-5,68)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
174	rs76481776	hsa-mir-182	CC	84(87,5)	22(91,7)	1	0,5556 dom
			CT	11(11,5)	2(8,3)	0,64(0,13-3,06)	
			TT	1(1,0)	0(0,0)		
175	rs76800617	hsa-mir-4521	AA	94(97,9)	21(100,0)	1	1 codom
			AG	2(2,1)	0(0,0)	00	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
176	rs77055126	hsa-mir-1303	FALLIDO				
177	rs7709117	hsa-mir-4634	AA	35(36,8)	7(28,0)	1	0,2147 rec
			AG	41(43,2)	10(40,0)	1,88(0,71-5,01)	
			GG	19(20,0)	8(32,0)		
178	rs77639117	hsa-mir-576	AA	93(96,9)	21(91,3)	3,12(0,70-13,86)	0,1282 log
			AT	3(3,1)	1(4,3)		
			TT	0(0,0)	1(4,3)		
179	rs78396863	hsa-mir-4743	GG	94(97,9)	24(100)	1	1 codom
			CG	2(2,1)	0(0)	00	
			CC	0(0,0)	0(0)		
180	rs78541299	hsa-mir-6075	MONOMORFICO				
181	rs78790512	hsa-mir-6083	GG	76(79,2)	20(83,3)	1	0,6425 dom
			AG	18(18,8)	4(16,7)	0,76(0,23-2,48)	
			AA	2(2,1)	0(0,0)		
182	rs78831152	hsa-mir-4789	CC	75(78,1)	18(90,0)	1	0,17358 codom
			CT	19(19,8)	1(5,0)	0,22(0,03-1,75)	
			TT	2(2,1)	1(5,0)	2,08(0,18-24,26)	
183	rs78832554	hsa-mir-4786	GG	93(97,9)	25(100,0)	1	1 codom
			AG	2(2,1)	0(0,0)	0(0-)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
184	rs7896283	hsa-mir-4481	AA	28(29,5)	3(15,8)	1	0,2003 dom
			AG	45(47,4)	11(57,9)	2,23 (0,60-8,26)	
			GG	22(23,2)	5(26,3)		
185	rs7911488	hsa-mir-1307	FALLIDO				

Tabla anexa 8. Resultados de SNPs en miRNAs en la población eslovena (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P
186	rs79397096	hsa-mir-597	GG	93(96,9)	25(100,0)	1	1 codom
			AG	3(3,1)	0(0,0)	0(0-)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
187	rs79512808	hsa-mir-3976	TT	91(94,8)	25(100,0)	1	0,5822 codom
			GT	5(5,2)	0(0,0)	0(0-)	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
188	rs80128580	hsa-mir-5707	GG	89(92,7)	21(91,3)	1	0,822 codom
			AG	7(7,3)	2(8,7)	1,21(0,23-6,25)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
189	rs8054514	hsa-mir-3176	TT	74(77,9)	17(73,9)	1	0,1949 rec
			GT	21(22,1)	5(21,7)	0	
			GG	0(0,0)	1(4,3)		
190	rs8078913	hsa-mir-4520a	CC	28(32,2)	0(0,0)	1	0,2159 codom
			CT	41(47,1)	0(0,0)	0	
			TT	18(20,7)	1(100,0)		
191	rs832733	hsa-mir-4698	FALLIDO				
192	rs850108	hsa-mir-550a-3	FALLIDO				
193	rs8667	hsa-mir-4751	GG	33(34,7)	11(47,8)	1	0,2492 dom
			AG	50(52,6)	8(34,8)	0,58(0,23-1,46)	
			AA	12(12,6)	4(17,4)		
194	rs877722	hsa-mir-4671	AA	76(79,2)	20(87,0)	1	0,09984 codom
			AT	20(20,8)	2(8,7)	0,38(0,08-1,76)	
			TT	0(0,0)	1(4,3)	0	
195	rs895819	mir-27a	FALLIDO				
196	rs897984	hsa-mir-4519	FALLIDO				
197	rs9295535	hsa-mir-5689	FALLIDO				
198	rs936581	hsa-mir-3141	GG	56(58,3)	12(50,0)	1	0,4627 dom
			AG	30(31,2)	9(37,5)	1,40(0,57-3,43)	
			AA	10(10,4)	3(12,5)		
199	rs9842591	hsa-mir-5186	CC	28(29,2)	8(34,8)	1	0,3745 rec
			AC	51(53,1)	9(39,1)	1,64(0,56-4,77)	
			AA	17(17,7)	6(26,1)		
200	rs9877402	hsa-mir-5680	AA	88(93,6)	17(85,0)	1	0,02950 rec
			AG	6(6,4)	1(5,0)	0	
			GG	0(0,0)	2(10,0)		
201	rs9913045	hsa-mir-548h-3	FALLIDO				
202	seq_rs11048315	MIR4302	GG	71(74,7)	19(76,0)	1	0,8382 rec
			AG	21(22,1)	5(20,0)	1,28(0,13-12,84)	
			AA	3(3,2)	1(4,0)		
203	seq_rs111803974	MIR3908	FALLIDO				
204	seq_rs111906529	MIR299, MIR380	TT	94(97,9)	24(96,0)	1	0,2066 rec
			CT	2(2,1)	0(0,0)	0	
			CC	0(0,0)	1(4,0)		
205	seq_rs112328520	MIR520G	CC	82(85,4)	24(100)	1	0,06972 codom
			CT	14(14,6)	0(0)	00	
			TT				
206	seq_rs11269	mir-1282	MONOMORFICO				
207	seq_rs113808830	MIR4532	CC	70(73,7)	18(85,7)	1	0,2222 dom
			CT	24(25,3)	3(14,3)	0,47(0,13-1,72)	
			TT	1(1,1)	0(0,0)		
208	seq_rs116932476	hsa-mir-4479	GG	92(97,9)	22(100)	1	1 codom
			AG	2(2,1)	0(0,0)	00	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		

Tabla anexa 8. Resultados de SNPs en miRNAs en la población eslovena (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P
209	seq_rs117258475	MIR296	GG	94(97,9)	24(100)	1	1 codom
			AG	2(2,1)	0(0,0)	00	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
210	seq_rs117650137	hsa-mir-6717	GG	89(92,7)	22(88,0)	1	0,4654 codom
			AG	7(7,3)	3(12,0)	1,73(0,41-7,25)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
211	seq_rs117723462	MIR3649	TT	96(100)	23(95,8)	1	0,2 codom
			GT	0(0,0)	1(4,2)	0	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
212	seq_rs163642	MIR4436B2	FALLIDO				
213	seq_rs62571442	MIR3689	AA	30(31,2)	5(23,8)	1	0,1210 rec
			AG	56(58,3)	11(52,4)	2,69(0,81-8,91)	
			GG	10(10,4)	5(23,8)		

Tabla anexa 9. Resultados de SNPs en miRNAs en las poblaciones española y eslovena (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P
1	rs10061133	hsa-mir-449b	AA	212(82,8)	74(81,3)	1	0,749 codom
			AG	44(17,2)	17(18,7)	1,11(0,6-2,06)	
			GG				
2	rs10173558	mir-1302-4	TT	198(77,3)	70(75,3)	1,12(0,67-1,89)	0,6636 log
			CT	56(21,9)	22(23,7)		
			CC	2(0,8)	1(1,1)		
3	rs10406069	hsa-mir-5196	GG	171(67,3)	57(62,6)	1	0,1075 rec
			AG	72(28,3)	33(36,3)	0,25(0,03-1,93)	
			AA	11(4,3)	1(1,1)	(-)	
4	rs10422347	hsa-mir-4745	CC	218(85,8)	68(74,7)	1,83(1,04-3,20)	0,02160 log
			CT	34(13,4)	23(25,3)		
			TT	2(0,8)	0(0,0)		
5	rs10461441	hsa-mir-548ae-2	FALLIDO				0,11281 codom
6	rs10505168	hsa-mir-2053	AA	123(48,2)	36(40,4)	1	0,11281 codom
			AG	107(42,0)	48(53,9)	1,53(0,93-2,54)	
			GG	25(9,8)	5(5,6)	0,68(0,24-1,91)	
7	rs1055070	hsa-mir-4700	TT	227(88,7)	83(91,2)	1	0,4928 codom
			GT	29(11,3)	8(8,8)	0,75(0,33-1,72)	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
8	rs1077020	hsa-mir-943	FALLIDO				
9	rs10878362	hsa-mir-6074	FALLIDO				
10	rs10934682	hsa-mir-544b	TT	182(71,1)	66(71,7)	1	0,2387 rec
			GT	69(27,0)	22(23,9)	2,28(0,60-8,69)	
			GG	5(2,0)	4(4,3)	(-)	
11	rs11014002	hsa-mir-603	FALLIDO				
12	rs11032942	hsa-mir-1343	FALLIDO				
13	rs11156654	mir-624	TT	150(58,8)	54(59,3)	1	0,5516 rec
			AT	85(33,3)	28(30,8)	1,29(0,56-2,95)	
			AA	20(7,8)	9(9,9)		
14	rs11237828	hsa-mir-5579	FALLIDO				
15	rs11259096	hsa-mir-1265	TT	231(90,6)	86(93,5)	1	0,385 codom
			CT	24(9,4)	6(6,5)	0,67(0,27-1,7)	
			CC	0(0,0)	0(0,0)		
16	rs11614913	hsa-mir-196a-2	CC	99(38,7)	35(38,0)	1,02(0,72-1,45)	0,8954 log
			CT	122(47,7)	44(47,8)		
			TT	35(13,7)	13(14,1)		
17	rs11651671	hsa-mir-548at	FALLIDO				
18	rs11713052	hsa-mir-5092	CC	240(93,8)	87(95,6)	1	0,5029 codom
			CG	16(6,2)	4(4,4)	0,69(0,22-2,12)	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
19	rs11714172	hsa-mir-4792	TT	111(43,5)	35(38,5)	1,22(0,86-1,72)	0,2643 log
			GT	113(44,3)	41(45,1)		
			GG	31(12,2)	15(16,5)		
20	rs11907020	hsa-mir-3192	MONOMORFICO				
21	rs11983381	hsa-mir-4653	AA	182(71,1)	63(70,8)	1	0,1385 rec
			AG	70(27,3)	22(24,7)	2,96(0,73-12,11)	
			GG	4(1,6)	4(4,5)		
22	rs12197631	hsa-mir-548a-1	FALLIDO				
23	rs12355840	hsa-mir-202	TT	179(70,5)	27(71,1)	1	0,3222rec
			CT	59(23,2)	10(26,3)	0,40(0,05-3,12)	
			CC	16(6,3)	1(2,6)		
24	rs12402181	hsa-mir-202	GG	196(76,6)	66(72,5)	1	0,4458 dom
			AG	57(22,3)	24(26,4)	1,24(0,72-2,13)	
			AA	3(1,2)	1(1,1)		
25	rs12451747	hsa-mir-1269b	FALLIDO				

Tabla anexa 9. Resultados de SNPs en miRNAs en las poblaciones española y eslovena (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P
26	rs12456845	hsa-mir-4744	TT	239(93,7)	84(90,3)	1	0,2905 codom
			CT	16(6,3)	9(9,7)	1,6(0,68-3,76)	
			CC	0(0,0)	0(0,0)		
27	rs12473206	hsa-mir-4433	FALLIDO				
28	rs12512664	hsa-mir-4274	AA	130(50,8)	44(48,4)	1,20(0,83-1,73)	0,3409 log
			AG	108(42,2)	36(39,6)		
			GG	18(7,0)	11(12,1)		
29	rs12523324	hsa-mir-4277	FALLIDO				
30	rs12780876	hsa-mir-4293	TT	115(45,3)	50(55,6)	1	0,09341 dom
			AT	116(45,7)	33(36,7)	0,66(0,41-1,07)	
			AA	23(9,1)	7(7,8)		
31	rs12803915	hsa-mir-612	GG	184(71,9)	54(61,4)	1	0,10542 codom
			AG	63(24,6)	32(36,4)	1,73(1,03-2,92)	
			AA	9(3,5)	2(2,3)	0,76(0,16-3,61)	
32	rs12879262	hsa-mir-4309	GG	188(73,7)	55(60,4)	1,52(0,96-2,40)	0,009763 log
			CG	61(23,9)	36(39,6)		
			CC	6(2,4)	0(0,0)		
33	rs12894467	hsa-mir-300	CC	99(38,7)	26(28,0)	1,57(1,11-2,22)	0,01029 log
			CT	124(48,4)	45(48,4)		
			TT	33(12,9)	22(23,7)		
34	rs13186787	hsa-mir-1294	FALLIDO				
35	rs13299349	hsa-mir-3152	GG	107(42,0)	14(35,0)	1	0,4018 dom
			AG	110(43,1)	19(47,5)	1,34(0,67-2,69)	
			AA	38(14,9)	7(17,5)		
36	rs1414273	hsa-mir-548ac	FALLIDO				
37	rs1439619	hsa-mir-3175	CC	68(26,6)	13(31,0)	0,87(0,56-1,37)	0,5567 log
			AC	120(46,9)	19(45,2)		
			AA	68(26,6)	10(23,8)		
38	rs1572687	hsa-mir-5007	CC	71(27,8)	28(31,1)	1	0,5577 dom
			CT	129(50,6)	44(48,9)	0,85(0,51-1,44)	
			TT	55(21,6)	18(20,0)		
39	rs1683709	hsa-mir-3612	CC	167(65,2)	63(68,5)	1	0,5714 dom
			CT	78(30,5)	25(27,2)	0,86(0,52-1,44)	
			TT	11(4,3)	4(4,3)		
40	rs17022749	hsa-mir-5700	FALLIDO				
41	rs17091403	hsa-mir-2110	CC	213(83,2)	81(85,3)	0,86(0,48-1,54)	0,6039 log
			CT	39(15,2)	13(13,7)		
			TT	4(1,6)	1(1,1)		
42	rs17111728	hsa-mir-4422	TT	219(85,5)	80(87,9)	0,90(0,46-1,79)	0,2066 log
			CT	37(14,5)	10(11,0)		
			CC	0(0,0)	1(1,1)		
43	rs174561	mir-1908	FALLIDO				
44	rs17737028	hsa-mir-3143	AA	252(98,4)	92(97,9)	1	0,724 codom
			AG	4(1,6)	2(2,1)	1,37(0,25-7,6)	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
45	rs17759989	hsa-mir-633	AA	244(95,3)	87(95,6)	1	0,9088 codom
			AG	12(4,7)	4(4,4)	0,93(0,29-2,98)	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
46	rs17797090	hsa-mir-3652	GG	209(81,6)	73(80,2)	0,99(0,57-1,74)	0,5784 log
			AG	43(16,8)	18(19,8)		
			AA	4(1,6)	0(0,0)		
47	rs17885221	hsa-mir-4733	CC	240(94,1)	86(93,5)	1	0,8268 codom
			CT	15(5,9)	6(6,5)	1,12(0,42-2,97)	
			TT	0(0,0)	0(0,0)		
48	rs2042253	hsa-mir-5197	AA	145(56,9)	59(63,4)	1	0,07623 rec
			AG	98(38,4)	33(35,5)	0,22(0,03-1,71)	
			GG	12(4,7)	1(1,1)		

Tabla anexa 9. Resultados de SNPs en miRNAs en las poblaciones española y eslovena (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P
49	rs2043556	hsa-mir-605	AA	161(62,9)	58(65,9)	1	0,6022 rec
			AG	84(32,8)	25(28,4)	1,34(0,45-3,97)	
			GG	11(4,3)	5(5,7)		
50	rs2060455	hsa-mir-4511	FALLIDO				
51	rs2070960	hsa-mir-3620	CC	216(85,0)	74(82,2)	1,45(0,82-2,57)	0,03528 log
			CT	38(15,0)	13(14,4)		
			TT	0(0,0)	3(3,3)		
52	rs2114358	hsa-mir-1206	TT	89(35,0)	33(35,9)	1	0,7592 rec
			CT	119(46,9)	41(44,6)	1,10(0,60-2,02)	
			CC	46(18,1)	18(19,6)		
53	rs215383	hsa-mir-4494	GG	177(69,4)	69(74,2)	0,78(0,48-1,28)	0,3159 log
			AG	72(28,2)	23(24,7)		
			AA	6(2,4)	1(1,1)		
54	rs2241347	hsa-mir-3130-1	FALLIDO				
55	rs2273626	hsa-mir-4707	CC	177(69,4)	69(74,2)	0,78(0,48-1,28)	0,3159 log
			AC	72(28,2)	23(24,7)		
			AA	6(2,4)	1(1,1)		
56	rs2289030	hsa-mir-492	CC	211(82,4)	79(85,9)	1	0,04152 rec
			CG	44(17,2)	10(10,9)	8,60(0,88-83,70)	
			GG	1(0,4)	3(3,3)		
57	rs2291418	hsa-mir-1229	CC	241(94,1)	90(94,7)	1	0,8292 dom
			CT	14(5,5)	5(5,3)	0,89(0,32-2,53)	
			TT	1(0,4)	0(0,0)		
58	rs2292181	hsa-mir-564	GG	229(89,5)	84(90,3)	1	0,8123 dom
			CG	26(10,2)	9(9,7)	0,91(0,41-2,01)	
			CC	1(0,4)	0(0,0)		
59	rs2292832	hsa-mir-149	FALLIDO				
60	rs2368392	hsa-mir-604	CC	130(51,0)	50(53,8)	1	0,6456 dom
			CT	104(40,8)	35(37,6)	0,89(0,56-1,44)	
			TT	21(8,2)	8(8,6)		
61	rs243080	hsa-mir-4432	CC	79(31,0)	33(37,1)	1	0,03137 codom
			CT	131(51,4)	32(36,0)	0,58(0,33-1,02)	
			TT	45(17,6)	24(27,0)	1,28(0,67-2,42)	
62	rs257095	hsa-mir-4636	AA	191(74,6)	74(80,4)	0,74(0,45-1,23)	0,2376 log
			AG	56(21,9)	16(17,4)		
			GG	9(3,5)	2(2,2)		
63	rs2648841	hsa-mir-1208	CC	199(78,3)	75(80,6)	1	0,5193 rec
			AC	52(20,5)	16(17,2)	1,84(0,30-11,18)	
			AA	3(1,2)	2(2,2)		
64	rs2663345	hsa-mir-3183	FALLIDO				
65	rs266435	hsa-mir-4804	CC	197(77,3)	69(76,7)	1	0,1395 rec
			CG	57(22,4)	19(21,1)	5,77(0,52-64,44)	
			GG	1(0,4)	2(2,2)		
66	rs2682818	hsa-mir-618	CC	195(76,5)	70(78,7)	0,88(0,52-1,51)	0,6418 log
			AC	56(22,0)	18(20,2)		
			AA	4(1,6)	1(1,1)		
67	rs28477407	hsa-mir-4308	CC	213(83,2)	81(86,2)	1	0,1487 rec
			CT	42(16,4)	11(11,7)	5,54(0,50-61,86)	
			TT	1(0,4)	2(2,1)		
68	rs28645567	hsa-mir-378d-1	GG	244(95,7)	89(96,7)	1	0,653 codom
			AG	11(4,3)	3(3,3)	0,75(0,2-2,74)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
69	rs28655823	hsa-mir-4472-1	GG	169(74,8)	69(75,8)	1	0,5872 rec
			CG	52(23,0)	19(20,9)	1,51(0,35-6,44)	
			CC	5(2,2)	3(3,3)		
70	rs28664200	hsa-mir-1255a	TT	137(54,6)	13(39,4)	1,91(1,08-3,36)	0,02693 log
			CT	102(40,6)	15(45,5)		
			CC	12(4,8)	5(15,2)		

Tabla anexa 9. Resultados de SNPs en miRNAs en las poblaciones española y eslovena (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P	
71	rs2910164	hsa-mir-146a	GG	144(56,2)	64(68,8)	1	0,03254 dom	
			CG	96(37,5)	23(24,7)	0,58(0,35-0,96)		
			CC	16(6,2)	6(6,5)			
72	rs2967897	hsa-mir-5695	MONOMORFICO					
73	rs3112399	hsa-mir-4803	TT	84(32,9)	22(24,7)	1	0,1425 dom	
			AT	109(42,7)	47(52,8)	1,50(0,86-2,59)		
			AA	62(24,3)	20(22,5)			
74	rs34115976	hsa-mir-577	CC	164(64,1)	66(72,5)	1	0,1378 dom	
			CG	79(30,9)	21(23,1)	0,68(0,40-1,14)		
			GG	13(5,1)	4(4,4)			
75	rs35196866	hsa-mir-4669	FALLIDO					
76	rs356125	hsa-mir-2278	GG	225(87,9)	90(94,7)	1	0,04597 dom	
			AG	30(11,7)	5(5,3)	0,40(0,15-1,07)		
			AA	1(0,4)	0(0,0)			
77	rs35613341	hsa-mir-5189	CC	121(47,3)	54(60)	1	0,004786 codom	
			CG	98(38,3)	18(20)	0,41(0,23-0,75)		
			GG	37(14,5)	18(20)	1,09(0,57-2,08)		
78	rs35650931	hsa-mir-6076	GG	203(79,6)	78(82,1)	1	0,5778 rec	
			CG	48(18,8)	17(17,9)	0,00(0,00-)		
			CC	4(1,6)	0(0,0)			
79	rs35770269	hsa-mir-449c	AA	103(40,4)	42(46,7)	0,78(0,54-1,11)	0,1644 log	
			AT	116(45,5)	40(44,4)			
			TT	36(14,1)	8(8,9)			
80	rs35854553	hsa-mir-3166	AA	222(87,1)	39(90,7)	1	0,4079 rec	
			AT	31(12,2)	3(7,0)	3,01(0,27-33,96)		
			TT	2(0,8)	1(2,3)			
81	rs367805	hsa-mir-3936	GG	118(46,3)	47(53,4)	1	0,2482 dom	
			AG	107(42,0)	30(34,1)	0,75(0,46-1,22)		
			AA	30(11,8)	11(12,5)			
82	rs3734050	hsa-mir-6499	CC	235(91,8)	79(87,8)	1	0,2704 codom	
			CT	21(8,2)	11(12,2)	1,56(0,72-3,37)		
			TT	0(0,0)	0(0,0)			
83	rs3746444	hsa-mir-499a	TT	170(66,4)	65(69,9)	1	0,3439 rec	
			CT	78(30,5)	23(24,7)	1,76(0,56-5,53)		
			CC	8(3,1)	5(5,4)			
84	rs3823658	hsa-mir-5090	GG	186(72,7)	70(75,3)	1	0,6237 dom	
			AG	66(25,8)	21(22,6)	0,8(7 0,5-1 1,51)		
			AA	4(1,6)	2(2,2)			
85	rs4112253	hsa-mir-4751	CC	103(40,2)	46(52,3)	0,67(0,46-0,98)	0,03452 log	
			CG	119(46,5)	35(39,8)			
			GG	34(13,3)	7(8,0)			
86	rs41274239	hsa-mir-96	MONOMORFICO					
87	rs41274312	hsa-mir-187	GG	252(98,8)	90(97,8)	1	0,5094 codom	
			AG	3(1,2)	2(2,2)	1,87(0,31-11,35)		
			AA	0(0,0)	0(0,0)			
88	rs41286570	hsa-mir-154	MONOMORFICO					
89	rs41291179	hsa-mir-216a	AA	230(89,8)	88(94,6)	1	0,1457 codom	
			AT	26(10,2)	5(5,4)	0,5(0,19-1,35)		
			TT	0(0,0)	0(0,0)			
90	rs41292412	hsa-mir-122	MONOMORFICO					
91	rs4285314	hsa-mir-3135b	FALLIDO					
92	rs4414449	hsa-mir-548ap	TT	60(35,3)	24(36,9)	1	0,5217 rec	
			CT	75(44,1)	30(46,2)	0,79(0,37-1,66)		
			CC	35(20,6)	11(16,9)			
93	rs45530340	hsa-mir-6084	MONOMORFICO					

Tabla anexa 9. Resultados de SNPs en miRNAs en las poblaciones española y eslovena (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P
94	rs4577031	hsa-mir-548ap	AA	88(34,4)	35(37,6)	0,89(0,63-1,27)	0,5218 log
			AT	127(49,6)	45(48,4)		
			TT	41(16,0)	13(14,0)		
95	rs4674470	hsa-mir-4268	TT	151(59,2)	67(75,3)	1	0,005698 dom
			CT	87(34,1)	19(21,3)	0,48(0,28-0,82)	
			CC	17(6,7)	3(3,4)		
96	rs4809383	hsa-mir-941-1	CC	192(75,9)	31(72,1)	1	0,1601 rec
			CT	58(22,9)	10(23,3)	4,07(0,66-25,07)	
			TT	3(1,2)	2(4,7)		
97	rs4822739	hsa-mir-548j	CC	227(88,7)	84(90,3)	1	0,6581 codom
			CG	29(11,3)	9(9,7)	0,84(0,38-1,85)	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
98	rs487571	hsa-mir-5680	FALLIDO				
99	rs4909237	hsa-mir-595	CC	177(69,1)	66(71,0)	1	0,6023 rec
			CT	71(27,7)	23(24,7)	1,39(0,41-4,74)	
			TT	8(3,1)	4(4,3)		
100	rs4919510	hsa-mir-608	CC	171(66,8)	65(69,9)	1	0,5832 dom
			CG	79(30,9)	26(28,0)	0,87(0,52-1,45)	
			GG	6(2,3)	2(2,2)		
101	rs515924	hsa-mir-548al	AA	206(80,8)	71(76,3)	1	0,1471 rec
			AG	48(18,8)	20(21,5)	5,58(0,50-62,30)	
			GG	1(0,4)	2(2,2)		
102	rs521188	hsa-mir-3671	AA	237(92,6)	85(91,4)	1	0,718 codom
			AG	19(7,4)	8(8,6)	1,17(0,5-2,78)	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
103	rs56088671	hsa-mir-4424	FALLIDO				
104	rs56103835	hsa-mir-323b	TT	170(66,4)	57(62,0)	1	0,4441 dom
			CT	78(30,5)	33(35,9)	1,21(0,74-1,99)	
			CC	8(3,1)	2(2,2)		
105	rs56195815	hsa-mir-548aw	FALLIDO				
106	rs56292801	hsa-mir-5189	GG	94(52,5)	57(64,0)	1	0,07162 dom
			AG	67(37,4)	23(25,8)	0,62(0,37-1,05)	
			AA	18(10,1)	9(10,1)		
107	rs57111412	hsa-mir-1283-1	FALLIDO				
108	rs58450758	hsa-mir-559	FALLIDO				
109	rs58834075	hsa-mir-656	CC	245(95,7)	89(93,7)	1	0,4457 codom
			CT	11(4,3)	6(6,3)	1,5(0,54-4,18)	
			TT	0(0,0)	0(0,0)		
110	rs5965660	hsa-mir-888	FALLIDO				
111	rs5997893	hsa-mir-3928	GG	116(45,3)	37(39,8)	1,24(0,88-1,75)	0,2140 log
			AG	111(43,4)	41(44,1)		
			AA	29(11,3)	15(16,1)		
112	rs60308683	hsa-mir-4762	FALLIDO				
113	rs6062431	hsa-mir-4326	GG	106(41,7)	46(49,5)	0,77(0,55-1,08)	0,1300 log
			CG	101(39,8)	35(37,6)		
			CC	47(18,5)	12(12,9)		
114	rs60871950	hsa-mir-4467	GG	78(30,6)	36(39,1)	1	0,10431 codom
			AG	121(47,5)	32(34,8)	0,57(0,33-1)	
			AA	56(22,0)	24(26,1)	0,93(0,50-1,73)	
115	rs61388742	hsa-mir-596	TT	205(80,1)	75(81,5)	1	0,7635 dom
			CT	49(19,1)	16(17,4)	0,91(0,50-1,68)	
			CC	2(0,8)	1(1,1)		
116	rs61938575	hsa-mir-3922	GG	126(49,4)	19(57,6)	1	0,3766 dom
			AG	112(43,9)	12(36,4)	0,72(0,35-1,50)	
			AA	17(6,7)	2(6,1)		
117	rs61992671	hsa-mir-412	GG	76(29,7)	18(20,7)	1	0,0973 dom
			AG	119(46,5)	47(54,0)	1,62(0,90-2,90)	
			AA	61(23,8)	22(25,3)		

Tabla anexa 9. Resultados de SNPs en miRNAs en las poblaciones española y eslovena (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(% control)	N(% casos)	OR (95%IC)	P
118	rs62154973	hsa-mir-4772	CC	200(78,1)	74(83,1)	1	0,3050 dom
			CT	53(20,7)	15(16,9)	0,72(0,39-1,36)	
			TT	3(1,2)	0(0,0)		
119	rs62376935	hsa-mir-585	CC	232(90,6)	85(93,4)	1	0,4051 dom
			CT	21(8,2)	5(5,5)	0,68(0,27-1,73)	
			TT	3(1,2)	1(1,1)		
120	rs641071	hsa-mir-4482	FALLIDO				
121	rs6430498	hsa-mir-3679	GG	117(45,9)	33(36,3)	1	0,1100 dom
			AG	111(43,5)	47(51,6)	1,49(0,91-2,44)	
			AA	27(10,6)	11(12,1)		
122	rs6505162	hsa-mir-423	FALLIDO				
123	rs6513496	hsa-mir-646	TT	165(64,5)	58(63,7)	1	0,3392 rec
			CT	80(31,2)	31(34,1)	0,50(0,11-2,30)	
			CC	11(4,3)	2(2,2)		
124	rs66507245	hsa-mir-4731	FALLIDO				
125	rs66683138	hsa-mir-3622a	FALLIDO				
126	rs67042258	hsa-mir-6128	GG	143(56,1)	59(65,6)	1	0,04218 codom
			AG	97(38,0)	22(24,4)	0,55(0,32-0,96)	
			AA	15(5,9)	9(10,0)	1,45(0,60-3,51)	
127	rs670637	hsa-mir-3167	MONOMORFICO				
128	rs67182313	hsa-mir-4642	AA	176(68,8)	64(72,7)	1	0,3560 rec
			AG	73(28,5)	23(26,1)	0,41(0,05-3,37)	
			GG	7(2,7)	1(1,1)		
129	rs6726779	hsa-mir-4431	TT	102(40,0)	36(40,9)	1	0,2998 rec
			CT	121(47,5)	37(42,0)	1,43(0,73-2,79)	
			CC	32(12,5)	15(17,0)		
130	rs67339585	MIR3910-1, MIR3910-2	FALLIDO				
131	rs6787734	hsa-mir-3135a	FALLIDO				
132	rs67976778	hsa-mir-4305	FALLIDO				
133	rs68035463	hsa-mir-3144	CC	167(65,5)	59(65,6)	1	0,4173 rec
			AC	79(31,0)	26(28,9)	1,61(0,52-4,93)	
			AA	9(3,5)	5(5,6)		
134	rs6841938	hsa-mir-1255b-1	FALLIDO				
135	rs6977967	hsa-mir-3683	AA	167(65,2)	49(53,8)	1	0,05600 dom
			AG	78(30,5)	36(39,6)	1,61(0,99-2,61)	
			GG	11(4,3)	6(6,6)		
136	rs6997249	hsa-mir-3686	FALLIDO				
137	rs701213	hsa-mir-4427	FALLIDO				
138	rs702742	hsa-mir-378h	AA	204(79,7)	77(84,6)	1	0,2951 dom
			AG	49(19,1)	13(14,3)	0,71(0,37-1,36)	
			GG	3(1,2)	1(1,1)		
139	rs7070684	hsa-mir-548aj-2	FALLIDO				
140	rs71363366	hsa-mir-1283-2	CC	238(93,7)	83(90,2)	1	0,2829 codom
			CG	16(6,3)	9(9,8)	1,61(0,69-3,79)	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
141	rs7205289	hsa-mir-140	MONOMORFICO				
142	rs7207008	hsa-mir-2117	TT	83(32,4)	26(27,4)	1	0,1120 rec
			AT	121(47,3)	42(44,2)	1,56(0,91-2,67)	
			AA	52(20,3)	27(28,4)		
143	rs7227168	hsa-mir-4741	CC	194(76,1)	70(76,1)	1	0,1132 rec
			CT	59(23,1)	19(20,7)	4,26(0,70-25,94)	
			TT	2(0,8)	3(3,3)		
144	rs7247237	hsa-mir-3188	CC	115(45,3)	37(40,2)	1	0,02753 rec
			CT	121(47,6)	41(44,6)	2,35(1,12-4,95)	
			TT	18(7,1)	14(15,2)		
145	rs72502717	hsa-mir-3689f	FALLIDO				
146	rs72631816	hsa-mir-105-2	FALLIDO				

Tabla anexa 9. Resultados de SNPs en miRNAs en las poblaciones española y eslovena (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P
147	rs72631825	hsa-mir-222	FALLIDO				
148	rs72631826	hsa-mir-16-1	MONOMORFICO				
149	rs72631827	hsa-mir-106b	MONOMORFICO				
150	rs72631831	hsa-mir-323b	MONOMORFICO				
151	rs72631833	hsa-mir-183	MONOMORFICO				
152	rs72646786	hsa-mir-3972	CC	196(76,6)	73(79,3)	1	0,5817 dom
			CT	57(22,3)	18(19,6)	0,85(0,48-1,52)	
			TT	3(1,2)	1(1,1)		
153	rs72855836	hsa-mir-3976	GG	232(90,6)	81(87,1)	1	0,3481 dom
			AG	22(8,6)	12(12,9)	1,43(0,68-2,99)	
			AA	2(0,8)	0(0,0)	(-)	
154	rs72996752	hsa-mir-4999	FALLIDO				
155	rs73112689	hsa-mir-4459	FALLIDO				
156	rs7311975	hsa-mir-1178	TT	237(92,6)	87(94,6)	1	0,5090 dom
			CT	18(7,0)	5(5,4)	0,72(0,26-1,98)	
			CC	1(0,4)	0(0,0)		
157	rs73147065	hsa-mir-647	FALLIDO				
158	rs73177830	hsa-mir-4532	FALLIDO				
159	rs73235381	hsa-mir-548h-4	FALLIDO				
160	rs73239138	hsa-mir-1269a	GG	144(56,7)	57(63,3)	0,78(0,52-1,18)	0,2290 log
			AG	93(36,6)	29(32,2)		
			AA	17(6,7)	4(4,4)		
161	rs73410309	hsa-mir-4739	FALLIDO				
162	rs74428911	hsa-mir-4474	GG	252(98,4)	93(98,9)	1	0,7194
			GT	4(1,6)	1(1,1)	0,68(0,07-6,14)	
			TT	0(0,0)	0(0,0)		
163	rs74469188	hsa-mir-6504	TT	252(98,4)	93(98,9)	1	0,7194 codom
			CT	4(1,6)	1(1,1)	0,68(0,07-6,14)	
			CC	0(0,0)	0(0,0)		
164	rs745666	hsa-mir-3615	CC	101(39,5)	33(35,1)	1	0,4568 dom
			CG	113(44,1)	48(51,1)	1,20(0,74-1,97)	
			GG	42(16,4)	13(13,8)		
165	rs74704964	hsa-mir-518d	CC	238(94,1)	40(95,2)	1	0,7581 codom
			CT	15(5,9)	2(4,8)	0,79(0,17-3,6)	
			TT	0(0,0)	0(0,0)		
166	rs74904371	hsa-mir-2682	CC	242(94,5)	88(93,6)	1,09(0,43-2,75)	0,7102 log
			CT	13(5,1)	6(6,4)		
			TT	1(0,4)	0(0,0)		
167	rs74949342	hsa-mir-5702	MONOMORFICO				
168	rs7500280	hsa-mir-4719	FALLIDO				
169	rs75019967	hsa-mir-4477a	MONOMORFICO				
170	rs7522956	hsa-mir-4742	AA	147(57,4)	53(58,2)	1	0,8399 rec
			AC	99(38,7)	34(37,4)	1,13(0,35-3,70)	
			CC	10(3,9)	4(4,4)		
171	rs75598818	hsa-mir-520f	GG	243(94,9)	87(94,6)	1	0,8951 codom
			AG	13(5,1)	5(5,4)	1,07(0,37-3,1)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
172	rs75715827	hsa-mir-944	TT	217(84,8)	80(89,9)	1	0,2157 dom
			CT	35(13,7)	9(10,1)	0,63(0,29-1,35)	
			CC	4(1,6)	0(0,0)		
173	rs75966923	hsa-mir-4298	CC	238(93,0)	90(95,7)	1	0,3246 codom
			AC	18(7,0)	4(4,3)	0,59(0,19-1,78)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
174	rs76481776	hsa-mir-182	CC	218(85,2)	78(83,9)	1	0,5561 (codom)
			CT	34(13,3)	15(16,1)	1,23(0,64-2,39)	
			TT	4(1,6)	0(0,0)	0,00(0,00-)	

Tabla anexa 9. Resultados de SNPs en miRNAs en las poblaciones española y eslovena (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%)control	N(%)casos	OR (95%IC)	P
175	rs76800617	hsa-mir-4521	AA	246(96,1)	87(96,7)	1	0,8034 codom
			AG	10(3,9)	3(3,3)	0,85(0,23-3,15)	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
176	rs77055126	hsa-mir-1303	FALLIDO				
177	rs7709117	hsa-mir-4634	AA	83(32,7)	35(37,6)	1	0,3903 dom
			AG	111(43,7)	38(40,9)	0,80(0,49-1,32)	
			GG	60(23,6)	20(21,5)		
178	rs77639117	hsa-mir-576	AA	249(97,3)	81(88,0)	1	0,001543 codom
			AT	7(2,7)	10(10,9)	4,39(1,62-11,91)	
			TT	0(0,0)	1(1,1)	0,0(0-)	
179	rs78396863	hsa-mir-4743	GG	248(97,3)	90(96,8)	1	0,8144 codom
			CG	7(2,7)	3(3,2)	1,18(0,3-4,67)	
			CC	0(0,0)	0(0,0)		
180	rs78541299	hsa-mir-6075	MONOMORFICO				
181	rs78790512	hsa-mir-6083	GG	182(71,1)	66(71,0)	1	0,6193 rec
			AG	66(25,8)	25(26,9)	0,68(0,14-3,27)	
			AA	8(3,1)	2(2,2)		
182	rs78831152	hsa-mir-4789	CC	208(81,2)	75(85,2)	1	0,3920 dom
			CT	45(17,6)	12(13,6)	0,75(0,39-1,46)	
			TT	3(1,2)	1(1,1)		
183	rs78832554	hsa-mir-4786	GG	242(94,9)	88(93,6)	1	0,6441 codom
			AG	13(5,1)	6(6,4)	1,27(0,47-3,44)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
184	rs7896283	hsa-mir-4481	AA	54(33,8)	6(22,2)	1	0,2223 dom
			AG	75(46,9)	15(55,6)	1,78(0,68-4,68)	
			GG	31(19,4)	6(22,2)		
185	rs7911488	hsa-mir-1307	FALLIDO				
186	rs79397096	hsa-mir-597	GG	249(97,3)	93(98,9)	1	0,3175 codom
			AG	7(2,7)	1(1,1)	0,38(0,05-3,15)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
187	rs79512808	hsa-mir-3976	TT	248(96,9)	94(100,0)	1	0,1146 codom
			GT	8(3,1)	0(0,0)	0(0-)	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
188	rs80128580	hsa-mir-5707	GG	240(93,8)	87(94,6)	1	0,776
			AG	16(6,2)	5(5,4)	0,86(0,31-2,42)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
189	rs8054514	hsa-mir-3176	TT	185(72,5)	61(66,3)	1	0,1132 rec
			GT	68(26,7)	28(30,4)	4,26(0,70-25,94)	
			GG	2(0,8)	3(3,3)		
190	rs8078913	hsa-mir-4520a	CC	75(30,5)	19(27,5)	1	0,3118 rec
			CT	121(49,2)	32(46,4)	1,38(0,74-2,57)	
			TT	50(20,3)	18(26,1)		
191	rs832733	hsa-mir-4698	FALLIDO				
192	rs850108	hsa-mir-550a-3	FALLIDO				
193	rs8667	hsa-mir-4751	GG	82(33,7)	29(31,5)	1	0,5567 rec
			AG	126(51,9)	52(56,5)	0,81(0,39-1,67)	
			AA	35(14,4)	11(12,0)		
194	rs877722	hsa-mir-4671	AA	191(74,6)	73(79,3)	1	0,3245 log
			AT	60(23,4)	18(19,6)	0,77(0,45-1,31)	
			TT	5(2,0)	1(1,1)		
195	rs895819	mir-27a	FALLIDO				
196	rs897984	hsa-mir-4519	FALLIDO				
197	rs9295535	hsa-mir-5689	FALLIDO				

Tabla anexa 9. Resultados de SNPs en miRNAs en las poblaciones española y eslovena (continua).

	SNP	Gen	Genotipo	N(%control)	N(%casos)	OR (95%IC)	P
198	rs936581	hsa-mir-3141	GG	172(67,2)	55(59,1)	1	0,1663 dom
			AG	70(27,3)	32(34,4)	1,41(0,87-2,31)	
			AA	14(5,5)	6(6,5)		
199	rs9842591	hsa-mir-5186	CC	71(27,7)	14(33,3)	1	0,4621 dom
			AC	130(50,8)	18(42,9)	0,77(0,38-1,54)	
			AA	55(21,5)	10(23,8)		
200	rs9877402	hsa-mir-5680	AA	233(92,5)	32(84,2)	1	0,002097 rec
			AG	19(7,5)	3(7,9)	0,00(-)	
			GG	0(0,0)	3(7,9)		
201	rs9913045	hsa-mir-548h-3	FALLIDO				
202	seq_rs11048315	MIR4302	GG	193(75,7)	67(71,3)	1	0,1781 rec
			AG	53(20,8)	26(27,7)	0,29(0,04-2,35)	
			AA	9(3,5)	1(1,1)		
203	seq_rs111803974	MIR3908	FALLIDO				
204	seq_rs111906529	MIR299, MIR380	TT	250(97,7)	90(95,7)	1	0,2686 rec
			CT	6(2,3)	3(3,2)	0,0(0-)	
			CC	0(0,0)	1(1,1)		
205	seq_rs112328520	MIR520G	CC	217(85,1)	81(89,0)	1	0,3438 codom
			CT	38(14,9)	10(11,0)	0,71(0,34-1,48)	
			TT	0(0,0)	0(0,0)		
206	seq_rs11269	mir-1282	MONOMORFICO				
207	seq_rs113808830	MIR4532	CC	200(78,4)	74(84,1)	1	0,2443 dom
			CT	51(20,0)	14(15,9)	0,69(0,36-1,31)	
			TT	4(1,6)	0(0,0)		
208	seq_rs116932476	hsa-mir-4479	GG	250(98,4)	89(98,9)	1	0,7453 codom
			AG	4(1,6)	1(1,1)	0,7(0,08-6,37)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
209	seq_rs117258475	MIR296	GG	249(97,6)	92(98,9)	1	0,4236 codom
			AG	6(2,4)	1(1,1)	0,45(0,05-3,8)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
210	seq_rs117650137	hsa-mir-6717	GG	241(94,1)	86(91,5)	1	0,3869 codom
			AG	15(5,9)	8(8,5)	1,49(0,61-3,65)	
			AA	0(0,0)	0(0,0)		
211	seq_rs117723462	MIR3649	TT	256(100,0)	92(98,9)	1	0,2665 codom
			GT	0(0,0)	1(1,1)	0(-)	
			GG	0(0,0)	0(0,0)		
212	seq_rs163642	MIR4436B2	FALLIDO				
213	seq_rs62571442	MIR3689	AA	85(33,7)	32(36,0)	1	0,7046 dom
			AG	131(52,0)	43(48,3)	0,91(0,55-1,50)	
			GG	36(14,3)	14(15,7)		

DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio fue la identificación de nuevos marcadores de riesgo genético en OS juvenil. Para ello, en primer lugar, realizamos una exhaustiva búsqueda bibliográfica para determinar las variantes genéticas ya descritas en la literatura asociadas con la susceptibilidad a desarrollar OS. Observamos que de todas las variantes genéticas descritas (n=5250 SNPs), tan sólo tres habían sido asociadas significativamente con el riesgo de OS en más de dos estudios: rs1690916 y rs2279744 en *MDM2* y rs231775 en *CTLA4*. Con la intención de validar estos resultados realizamos un estudio de asociación caso-control con estos tres SNPs. En el caso de los polimorfismos rs1690916 y rs2279744 del gen *MDM2*, no encontramos asociación con el riesgo de OS, ni en nuestro estudio de asociación, ni incluyendo todas las poblaciones estudiadas hasta el momento en un nuevo MA. Los resultados obtenidos en nuestro MA estuvieron en discordancia con otro publicado durante el transcurso de esta tesis. Tras la revisión de dicho MA, nuestro grupo, al igual que Liu y cols., observamos ciertas inexactitudes en los análisis que serán discutidos en este trabajo. En el gen *CTLA4*, en cambio, sí observamos asociación entre rs231775 y el riesgo de OS en nuestra población española, concluyendo que de toda la revisión bibliográfica realizada, sólo una variante genética de todas las descritas en la literatura parecía incrementar el riesgo de OS. Ante la escasez de resultados significativos en genes codificantes y teniendo en cuenta la importancia que tienen hoy día los genes no codificantes, decidimos buscar nuevos marcadores de riesgo de OS en genes no codificantes, analizando por un lado la variabilidad genética de los genes de procesamiento de los miRNAs y por otro, los polimorfismos de los propios miRNAs. Identificamos tres SNPs en genes del complejo RISC asociados con el riesgo de OS, en los genes *CNOT1*, *CNOT4* y *SND1*. En el estudio extensivo de variantes genéticas de miRNAs se detectaron un total de 26 SNPs en 25 miRNAs que podrían estar implicados en la susceptibilidad del OS. El resultado más destacable se encontró en la población española, en la que 4 polimorfismos en 4 miRNAs del *cluster* de la región 14q32 se asociaron con el riesgo de OS, *cluster* que regula *MYC* y cuya desregulación ya ha sido asociada con OS. Estos resultados indican un posible *hotspot* de susceptibilidad del OS. En este estudio, se encontraron también significativas variantes en mir-499 y mir-146a, variantes que ya habían sido asociadas a otros cánceres. Además, encontramos nuevos marcadores al analizar las dos poblaciones conjuntamente en mir-146a, mir-4752 y mir-6128. Estos resultados nos llevan a pensar que estos 3 polimorfismos en miRNAs funcionan como posibles marcadores de susceptibilidad de OS a nivel poblacional.

1. SNPS EN EL GEN *MDM2*

Tras una exhaustiva búsqueda bibliográfica para determinar las variantes genéticas descritas en la literatura asociadas con la susceptibilidad a desarrollar OS (n=5250 SNPs), observamos que tan sólo tres SNPs habían sido asociados con el riesgo de OS en al menos en dos trabajos: dos de ellas, rs1690916 y rs2279744 en el gen *MDM2*.

El gen *MDM2* se localiza en la región 12q14.3 y tiene una longitud de 37,373 pb. *MDM2* codifica para una proteína nuclear E3 ubiquitín ligasa (*MDM2*) que regula la degradación de la proteína supresora de tumores p53 (32). A su vez, la activación del gen *TP53* trans-activa el promotor del gen *MDM2*. Mediante este sistema, los genes *MDM2* y *TP53* se regulan mutuamente, llevando a la célula a activar el ciclo celular o la apoptosis (152). En OS, *MDM2* se encuentra amplificado en un 10% de los casos (3). Esto lleva a pensar que cualquier alteración en la función de este gen podría afectar en la susceptibilidad del OS. En esta línea, diversos estudios han analizado la asociación de polimorfismos en este gen y el riesgo a padecer OS. Hasta la fecha, se han descrito 7 polimorfismos en dicho gen que podrían conferir un incremento en el riesgo a desarrollar la enfermedad (33-36, 54), de los que tan solo dos (rs1690916 y rs2279744) fueron asociados en al menos dos artículos con el riesgo a desarrollar OS. El SNP rs1690916 está situado en la región 3'UTR del gen, con lo que podría afectar a la estructura y estabilidad del mRNA, alterando la vida media del mismo (153). El SNP rs2279744, también conocido como SNP390 por su localización en el nucleótido 309 del primer intrón, se encuentra situado en la región potenciadora del segundo promotor del gen. Se ha demostrado que rs2279744 aumenta la afinidad de unión del factor de transcripción Sp1 al promotor, elevando el nivel basal de *MDM2* (30). El aumento de la concentración de *MDM2* podría derivar en una disminución de la respuesta apoptótica de p53, lo que podría conllevar a la formación del tumor (154). Por estas razones, es lógico pensar que estos dos SNPs puedan contribuir al riesgo de OS.

En nuestro estudio los SNPs rs1690916 y rs2279744 del gen *MDM2* no mostraron asociación con el riesgo a desarrollar OS. En línea con estos resultados, un reciente GWAS tampoco encontró asociación estadísticamente significativa entre el gen *MDM2* y OS (58). Estos resultados no coincidían con algunos de los resultados previamente publicados en la literatura (33, 35). En vista de la disparidad de los resultados, en este trabajo realizamos un MA incrementando el número de poblaciones y por tanto, aumentando el poder estadístico. Además, nuestro MA siguió las indicaciones de la guía PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*) con el fin de aportar un estudio de calidad: se

utilizaron estrategias de búsqueda bien definidas: la selección de artículos y extracción de los datos fue realizada por dos investigadores independientes; se evaluó la calidad de todos los estudios; se incluyeron todos los valores absolutos de los datos genotípicos de los estudios u obtenidos del análisis de asociación en este trabajo.

El MA de rs1690916 incluyó un total de 464 casos de OS y 2048 controles procedentes de 4 poblaciones. No encontramos asociación entre rs1690916 y OS bajo ninguno de los modelos de herencia (OR: 0,89; IC 95%: 0,54-1,45, modelo alélico; OR: 0,80; IC 95%: 0,28-2,29, modelo codominante; OR: 0,80; IC 95%: 0,40-1,60, modelo recesivo; OR: 0,87; IC 95%: 0,44-1,74, modelo dominante). Observamos que el alelo de menor frecuencia (A) por un lado, aumentaba el riesgo en las poblaciones española y eslovena, mientras que por otro lado, este alelo disminuía el riesgo en las poblaciones rusa y americana. Estos resultados de OR contradictorios en las 4 poblaciones muestran que no se puede postular una clara tendencia de riesgo en la población general.

El MA de rs2279744 incluyó un total de 433 casos de OS y 1959 controles procedentes de cinco poblaciones. Nuevamente, no encontramos asociación entre el SNP y la susceptibilidad a desarrollar OS, bajo ninguno de los modelos de herencia (OR: 1,16; IC 95%: 0,87-1,54, modelo alélico; OR: 1,33; IC 95%: 0,74-2,42, modelo codominante; OR: 1,27; IC 95%: 0,77-2,10, modelo recesivo; OR: 1,22; IC 95%: 0,90-1,66, modelo dominante). En este caso, encontramos que el alelo de menor frecuencia (G) aumentaba el riesgo de las poblaciones americana, australiana e italiana y lo disminuía en la española y eslovena, por lo que al igual que en el caso anterior, no se puede postular una tendencia de riesgo en la población general.

Durante el transcurso de este proyecto de tesis, se publicó un MA que analizaba los polimorfismos estudiados (rs1690916 y rs2279744) y el riesgo de OS, concluyendo que estos dos polimorfismos estaban asociados con el riesgo a desarrollar OS (151), resultados opuestos a los nuestros.

Este MA fue cuestionado por una carta al editor enviada por Liu y cols., donde se criticaba el reducido número y la calidad de artículos incluidos, la carencia de información en los métodos utilizados, la falta de análisis del EHW en la población control y la calidad de los estudios incluidos en el MA (155). Es decir, no seguían los criterios de la guía PRISMA mencionada previamente.

En esta línea, nosotros también detectamos otras inexactitudes en el MA de Wang et al. En relación al polimorfismo rs1690916, observamos que la muestra de pacientes de origen ruso (36) incluía muestras de otros tumores óseos en lugar de ceñirse sólo a OS. En el caso de rs2279744, el MA de Wang y cols no aportaba información de las frecuencias alélicas y/o genotípicas, por lo que fue necesario extraer dicha información de los artículos originales. Al extraer dicha información de los artículos originales el grupo control de Ito y cols fue difícil de establecer. En este caso, la única población que, *a priori* podría ser incluida como control, eran pacientes con tumores benignos (34). Esto puede considerarse un error en el estudio ya que los grupos control de los estudios de susceptibilidad no deben estar afectados por otras enfermedades, porque sus características genéticas pueden ser diferentes a la de la población sana (142). En nuestro análisis la población de Ito no mostró resultados estadísticamente significativos (OR: 1,16; IC 95%: 0,87-1,54, modelo alélico) en contra de lo obtenido por Wang y cols (OR: 1,60; IC 95%: 1,23-2,07, modelo alélico).

A pesar de la mejora en la calidad y número de muestra en nuestro MA, pensamos que es necesario incluir nuevas poblaciones, dado que el tamaño de muestra sigue siendo limitado por la baja frecuencia de esta patología en la población.

En resumen, tras la revisión bibliográfica, el estudio de asociación y posterior MA en relación con los polimorfismos en *MDM2*, podemos concluir que rs1690916 y rs2279744 no parecen incrementar el riesgo de OS.

2. SNPS EN EL GEN *CTLA4*

La tercera variante genética que se encontraba asociada con el riesgo de OS en la literatura en al menos dos estudios fue rs231775 en el gen *CTLA4*.

El gen *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4 o CD152)*, localizado en la región 2q33.2, es miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y se expresa en la superficie de las células T ante una respuesta inmune. CTLA4 transmite una señal que regula negativamente la proliferación y activación de las células T provocando la parada del ciclo celular y la inhibición de la producción de citoquinas (156). En consecuencia, la downregulación de la respuesta de las células T produce una disminución de la respuesta antitumoral incrementando la susceptibilidad a desarrollar cánceres (37, 38). Varios estudios han sugerido que *CTLA4* podrían estar asociado en el desarrollo de diversos cánceres como cáncer colorrectal (157)(157)(157)(156)(156)(153), cáncer de pulmón (158), cáncer de cérvix (159), cáncer gástrico y de mama (160). Contardi y cols observaron que *CTLA4* se expresa y que participa en la apoptosis de células tumorales de OS, lo que sugiere que polimorfismos en dicho gen podrían contribuir al desarrollo de OS (161). De hecho, ya se han descrito 3 polimorfismos asociados con OS (55, 56, 116, 162, 163) pero sólo uno (rs231775) ha sido asociado con esta enfermedad en más de dos ocasiones (116, 162). El interés de este SNP radica también en que tiene una posible explicación funcional: está localizado en el primer exón y provoca un cambio de nucleótido (ACC>GCC), que altera la secuencia de la proteína (Thr>Ala), pudiendo alterar la función de la misma.

En nuestro estudio de asociación, el genotipo AG+GG (*versus* AA) disminuía de manera significativa el riesgo de OS en población española (OR: 0,45, IC 95%: 0,24-0,83). Por tanto, el genotipo AA mostró un incremento del riesgo a desarrollar OS. Estos resultados están en concordancia con los dos estudios previos en poblaciones china donde el genotipo AA (OR: 2,20, IC 95%: 1,23–3,95 y OR: 2.27, IC 95%: 1,21–4,25) también estuvo asociado con un incremento del riesgo de OS.

Este resultado se confirmó mediante un meta-análisis que incluía las tres poblaciones en la que tanto el genotipo AA (OR: 2,07, IC 95%: 1,48- 2,89) como el alelo A (OR: 1,36, IC 95%: 1,15- 1,61) conferían un incremento del riesgo a desarrollar OS. En línea con nuestros resultados, este SNP también se ha asociado a cáncer de pulmón (158), cancer de cérvix (159), sarcoma de Ewing (164), cancer gástrico, de mama (165) y cancer hepatocelular (166). Estos resultados podrían explicarse porque, tal y como se ha comentado previamente, el alelo +49A

causa un cambio de aminoácido (Thr>Ala), y se ha observado que este cambio provoca una mayor eficacia y un incremento de la producción de CTLA4 (40, 167), por lo que la respuesta antitumoral podría atenuarse e incrementar la susceptibilidad a desarrollar OS.

Nuestros resultados indican que el genotipo AA del SNP rs231775 puede estar asociado con el riesgo a desarrollar OS; por lo que el gen *CTLA4* podría ser un marcador potencial de la susceptibilidad del OS.

3. SNPS EN GENES RELACIONADOS CON LOS MIRNAS

De todos los estudios de variantes genéticas analizados bajo la estrategia de genes candidatos realizados hasta el momento, solo el polimorfismo rs231775 del gen *CTLA4* ha mostrado ser un posible marcador de riesgo a desarrollar OS. Ante la escasez de resultados en genes codificantes y teniendo en cuenta la importancia que han adquirido los genes no codificantes, decidimos buscar marcadores de riesgo de OS entre estos genes. Dentro de éstos, los miRNAs son los más estudiados y se sabe que están implicados en el origen y evolución de diversos cánceres. En el caso del OS, se han realizado un gran número de estudios analizando la expresión de miRNAs implicados en la evolución del OS. Se han encontrado miRNAs desregulados cuyas dianas son genes que participan en los procesos de formación del hueso, proliferación, migración e invasión. Por lo tanto, la alteración de los niveles de expresión de los miRNAs podría estar no solo implicados en la evolución, sino también ser clave en el origen del OS. Los niveles de los miRNAs están regulados, en gran parte, por los genes de procesamiento. Variantes genéticas en estos genes ya han sido asociadas a la susceptibilidad a desarrollar diferentes cánceres. Por ello, analizamos toda la variabilidad genética de los genes de la ruta de procesamiento de los miRNAs y su implicación en la susceptibilidad del OS.

3.1 SNPS EN GENES DE PROCESAMIENTO DE MIRNAS

El estudio de asociación entre 72 SNPs en 21 genes de procesamiento y el riesgo de OS mostró tres SNPs significativos (rs11866002, rs3812265 y rs3823994) en tres genes del complejo RISC: *CNOT1*, *CNOT4* y *SND1*. De ellos, los genes *CNOT1* y *CNOT4* forman el complejo CCR4-NOT dentro del complejo RISC (168, 169). Tras la corrección por Bonferroni, el SNP rs11866002 en el gen *CNOT1* se mantuvo cercano al valor de significancia ($p=0,08$).

En el análisis de los genes del complejo CCR4-NOT, el genotipo CC del polimorfismo rs11866002 del gen *CNOT1* estuvo asociado con un aumento del riesgo a desarrollar OS. Este SNP, que fue el más significativo del estudio, está localizado en el exón 22 del gen, y causa un cambio sinónimo (CAG >CAA, hebra *reverse*), es decir, no altera el aminoácido de la proteína (Gln>Gln), pero debido a su localización, potencialmente podría afectar a la regulación del *splicing* (F-SNP) (170) y a la expresión del gen (171). De hecho, la expresión de *CNOT1* varía en función del genotipo de rs11866002 en distintas poblaciones de HapMap (172). Este resultado fue similar al encontrado por nuestro grupo en leucemia linfoblástica aguda infantil (LLA),

donde el genotipo CC también aumentaba el riesgo de LLA (87). Estos resultados sugieren que el SNP rs11866002 podría estar asociado, de manera más general, con la susceptibilidad al cáncer. En el caso del gen *CNOT4* del complejo CCR4-NOT, el genotipo CT+TT del SNP rs3812265 se asoció con el incremento de la susceptibilidad a OS ($p=0,025$). Este SNP, localizado en el exón 10, es una variante con cambio de sentido (*missense*) (GTA>ATA, hebra *reverse*) que altera la secuencia de la proteína (Val>Ile) (170), lo que podría afectar a la función de la misma. El complejo CCR4-NOT es el encargado de eliminar la cola poly(A) de los mRNAs dianas unidos a los miRNAs (173). Por lo tanto, polimorfismos en *CNOT1* y *CNOT4* podrían alterar la deadenilación de los mRNAs de genes implicados en el origen y evolución del OS.

Finalmente, el genotipo TT del SNP rs3823994 en el gen *SND1* mostró asociación con una disminución del riesgo a desarrollar OS. Este SNP, localizado en el intron 16, potencialmente afecta a la regulación del *splicing* (F-SNP). Dentro del complejo RISC, el gen *SND1* tiene función de nucleasa (174), controlando la degradación de los miRNAs editados (175). Diversos autores han observado la desregulación de este gen en diferentes tipos de cáncer, como carcinoma hepatocelular (176) o melanoma maligno cutáneo primario (177). En OS, la desregulación de *SND1* podría afectar a los niveles de diversos miRNAs implicados en el desarrollo de la enfermedad. De hecho, se ha descrito que el silenciamiento de *SND1* incrementa la expresión de los miembros del cluster miR-17-92 maduro (178), un cluster sobreexpresado en OS y asociado con la proliferación, invasión y migración de las células del OS (179).

El hallazgo más importante de este estudio es que los tres SNPs asociados con la susceptibilidad a OS se encuentran localizados en genes pertenecientes al complejo RISC. Este complejo, formado por 15 genes, es el encargado junto con el miRNA (miRISC), de degradar o inhibir la traducción de los mRNAs diana (180). Algunos estudios han mostrado que la desregulación de los genes de este complejo afecta al silenciamiento de los RNAs dianas de los miRNAs. Por ejemplo, se ha observado que la depleción de *TNRC6A* conlleva a la sobreexpresión de muchas dianas de miRNAs (181). Del mismo modo, la desregulación de los genes de este complejo también puede afectar a los niveles de miRNAs. Por ejemplo en mieloma múltiple, se ha correlacionado la desregulación de *EIF2C2* con el incremento de los niveles de miRNAs (182). Por lo tanto, SNPs en alguno de los componentes del complejo RISC podrían afectar a su función y alterar la regulación del mRNA mediante miRNA.

La implicación de las variantes genéticas en los genes de procesamiento de miRNAs en OS se ha analizado posteriormente por el grupo de Weng Y y cols obteniendo resultados significativos en los genes *GEMIN4* (complejo RISC), *DROSHA* (complejo DROSHA/DGCR8) y *DICER1* (complejo DICER) (183). La disparidad de los resultados puede deberse al origen de esta población, en este caso asiática y a que en este estudio, no analizaron todos los componentes de esta ruta (genes *AGO1*, *DDX17*, *DDX5*, *DICER1*, *DROSHA*, *GEMIN4*, *RAN*, *SNIP1* y *XPO5*). A pesar de ello, este estudio refuerza la idea de la implicación de los genes de la ruta de procesamiento de miRNAs en la susceptibilidad a desarrollar OS.

En conclusión, por primera vez, encontramos que SNPs en genes del complejo RISC (rs11866002 en *CNOT1*, rs3812265 en *CNOT4* y rs3823994 *SND1*) podrían estar implicados en la susceptibilidad a desarrollar OS.

3.2 SNPS EN MIRNAS

Los niveles aberrantes de los miRNAs pueden deberse a variantes en los genes de procesamiento, pero también la función de los miRNAs puede verse alterada por la existencia de variantes genéticas en los propios miRNAs. Estas variaciones pueden afectar tanto a los niveles de expresión del propio miRNA como a la unión con sus regiones dianas. Muchos estudios han descrito polimorfismos en miRNAs asociados con diferentes tipos de cáncer (mir-SNPs). Incluso se han realizado revisiones y MA sobre la existencia de asociación entre determinados mir-SNPs y el riesgo de cáncer, como es el caso de mir-146a rs2910164, mir-149 rs2292832 y mir-196a2 rs11614913 (107, 108). Sin embargo, a pesar de la importancia que parecen tener los miR-SNPs en el desarrollo del cáncer, en OS apenas se han realizado trabajos al respecto.

En el presente estudio analizamos con éxito un total de 213 polimorfismos en 206 genes de pre-miRNAs en 100 casos de OS (<34 años) (74 casos de España y 26 de Eslovenia) y 256 controles. Encontramos un total de 14 SNPs en 14 pre-miRNAs asociados con el riesgo a desarrollar OS en la población española y 9 SNPs en 8 pre-miRNAs en la población eslovena ($p < 0,05$). Cuando analizamos las poblaciones conjuntamente, encontramos un total de 12 SNPs significativos en 12 miRNAs.

En la población española, el genotipo TT del SNP rs12894467 localizado en miR-300 fue el resultado más significativo del estudio (OR=2,01). Este SNP también resultó significativo cuando se analizaron conjuntamente las poblaciones española y eslovena (OR=1,62). El miRNA miR-300 está localizado en la región 14q32, que alberga un *cluster* de miRNAs. En OS, se ha observado que algunos miRNAs de este *cluster* (miR-382, miR-134, miR-544 y miR-369-3p) están downregulados y upregulan cooperativamente el oncogen *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homologue (avian) (MYC)* (184). La activación del gen *MYC* juega un importante papel en la patogénesis del OS, ya que está implicado en el proceso de transformación de células del estroma de la médula ósea a células de OS (185). A pesar de que miR-300 no está en este listado, comprobamos *in silico*, que miR-300 también regula el gen *MYC* (186). Además la posible implicación de mir-300 en la tumorigénesis del OS se ve reforzada por el hecho de que Thayanithy y cols demostraron que el bloqueo de los miRNAs de esta región aumenta la capacidad de proliferación, migración e invasión de los osteoblastos (184). Una posible explicación de la asociación encontrada en el SNP rs12894467 es el hecho de que este SNP está localizado en el pre-miRNA, por lo que el alelo T podría afectar a su procesamiento y por

tanto, podría downregular mir-300. En este estudio, otros 3 SNPs significativos se encontraban localizados en miRNAs (mir-4309, mir-656 y mir-412) del cluster de la región 14q32. Teniendo en cuenta nuestros resultados y que ya se ha descrito que la desregulación de los miRNAs de este *cluster* puede ser causada por los frecuentes reordenamientos en esta región en OS (101), la región 14q32 podría ser considerada un *hotspot* en la susceptibilidad a desarrollar esta patología.

El SNP rs356125 en mir-2278, localizado en 9q22 se asoció también con el riesgo a desarrollar OS. En este SNP, el alelo G incrementaba el riesgo de OS (OR=9,8) en la población española. Sin embargo, este resultado no se confirmó ni en la población eslovena ni en la población conjunta, siendo por tanto una característica propia de la población española. Mir-2278 está localizado en la región intrónica del gen *C9orf3*, miembro de la familia M1 de aminopeptidasas dependientes de zinc. Este gen ha sido previamente asociado con disfunción eréctil y síndrome de ovarios poliquísticos, ambas enfermedades originadas por una cantidad inadecuada o excesiva de hormonas sexuales (187, 188). En relación con el OS, diversos autores sugieren que los cambios hormonales podrían estar implicados en la etiología de la enfermedad (28), lo que explicaría la asociación encontrada entre este polimorfismo y el riesgo de OS.

Otro resultado significativo fue rs77639117 en mir-576, donde el alelo T incrementaba el riesgo de OS (OR=5,85). En línea con estos resultados, los genotipos AT/TT mostraron un incremento del riesgo a desarrollar OS en la población conjunta (OR=4,83). La expresión de este miRNA en OS ha sido previamente analizada por diversos autores, obteniendo resultados contradictorios: mientras Won KY y cols y Maire G y cols., no detectaron cambios de expresión (menos de 8 casos analizados)(101, 189), Sarver y cols observaron una sobreexpresión de mir-576 en 15 muestras de OS (190). Una posible diana de mir-576 es el gen supresor de tumores *RB1* (análisis *in silico*, miRWalk). Este gen, como ya se ha comentado anteriormente en el apartado de introducción, tiene una gran relevancia en OS, ya que se encuentra inactivado en aproximadamente el 35% de pacientes con OS esporádico (3). Teniendo en cuenta lo anterior, una posible explicación a nuestro resultado sería que el alelo rs77639117-T provoca una upregulación de mir-576, quien a su vez downregularía *RB1*, llevando a la inactivación del gen. Este mecanismo, podría constituir una vía alternativa de inactivación a las mutaciones y pérdidas de heterocigosidad en *RB1*.

El cuarto resultado más significativo del estudio fue el polimorfismo rs7247237 en mir-3188, localizado en 19p13. El genotipo TT incrementaba el riesgo en la población española (OR= 3,59). Esta asociación se mantuvo significativa en la población conjunta (OR=2,35), pero no en la población eslovena. A pesar de que no se conocen las dianas de este miRNA, es interesante remarcar que mir-3188 está localizado en la región aguas arriba del proto-oncogen *jun D proto-oncogene (JUND)*. Este gen codifica para la proteína JUND, un componente del factor de transcripción *activator protein 1 (AP1)*. Se ha observado que al inhibir la actividad transcripcional de AP1 se bloquea la migración, invasión y metástasis de las células de OS en ratones (191).

El quinto resultado más significativo fue el polimorfismo rs2289030 en mir-492, donde el genotipo GG del SNP se asoció con un menor riesgo a desarrollar OS. Se ha demostrado que la sobre-expresión de este miRNA provoca una disminución de la expresión del gen supresor de tumores *PTEN* en cáncer hepático (192). En cambio, dos estudios en OS no encontraron alteraciones en la expresión de este miRNA (101, 189); resultados que, sin embargo, hay que tomar con cautela puesto que el número de muestras analizadas en ambos estudios fue muy bajo (≤ 7 muestras de OS). El gen *PTEN* codifica la proteína PTEN, una fosfatasa que participa en la activación de la vía PI3K, modulando la progresión del ciclo celular y la supervivencia de la célula (193). Diversos estudios han mostrado que *PTEN* está downregulado en pacientes con OS y líneas celulares de OS, debido a una upregulación de los miRNAs mir-128 y mir-17 (149, 194, 195). Además, se ha observado en líneas celulares de OS que la upregulación de *PTEN* atenúa la capacidad de adhesión, migración e invasión de las células tumorales (196), lo que pone de manifiesto la relación entre este gen y el OS. En vista de estos resultados, nosotros podemos suponer que el genotipo GG del SNP rs2289030 podría provocar la upregulación de mir-492 y un exceso de este miRNA podría disminuir la expresión del gen *PTEN*. Apoyando esta idea, observamos *in silico* que el alelo rs2289030-C modificaba la estructura secundaria de mir-492, pudiendo alterar su procesamiento y finalmente sus niveles.

El SNP rs10505168 localizado en el mir-2053 fue el sexto SNP más significativo en la población española, donde el genotipo AG incrementó el riesgo de OS (OR=2,02). Este resultado no se confirmó ni en la población eslovena ni en la conjunta. Este miRNA no tiene, en principio, ninguna diana conocida. Sin embargo, está localizado en la región intrónica del gen *CUB and Sushi multiple domains 3 (CSMD3)* en la región 8q23. Es interesante remarcar que SNPs de este gen están en fuerte desequilibrio de ligamiento con SNPs de la región 8q24 en población caucasoide (197), donde se localiza el oncogen *MYC*.

El SNP rs60871950 de mir-4467 fue el séptimo SNP más significativo en la población española, en la que el genotipo AA confería protección en OS (OR= 0,39). Nuevamente, este resultado no se confirmó ni en población eslovena ni en la población conjunta. Este miRNA se encuentra sobre-expresado en glioma y potencialmente podría regular el gen *SF1* (198), implicado en procesos de reparación del ADN (199). Defectos en las rutas de reparación del ADN ya han sido asociados con el riesgo de OS (28), por lo que rs6087195 podría alterar los niveles de expresión de mir-4467, lo que podría alterar a su vez el gen *SF1*.

El siguiente resultado más significativo (rs10406069) se localizaba en mir-5196 que actualmente, no tiene ningún gen diana conocido. No obstante, el SNP rs10406069 en mir-5196 colocaliza con en el duodécimo exón del gen *CD22*, el cual codifica para un antígeno localizado en la superficie celular de los linfocitos B humanos (200). A pesar de que la implicación del sistema inmune en OS no está del todo clara (201), sí que se han detectado polimorfismos en otros genes de antígenos como es el caso de *CTLA4* asociados con el riesgo a desarrollar OS (55-57).

Otro resultado interesante fue la asociación encontrada entre el SNP rs702742 en mir-378h (OR=0,42) y el riesgo a desarrollar OS. Los miR-378a/b/c/d/e/f/h/i pertenecen a una gran familia de miRNAs evolutivamente muy conservada que parece estar sobre-expresada en el tejido tumoral de OS (101, 190, 202-204). Además, se ha demostrado que miR-378 participa en la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos mediante la regulación de diversos genes dianas (205-207). Por un lado, You L y cols demostraron que la sobre-expresión de miR-378 de manera ectópica restablece la mineralización de los osteoblastos gracias a que *CASP3*, diana de miR-378, promueve la diferenciación de los osteoblastos (205). Por otro lado, Kahai et al observaron que la sobre-expresión de miR-378 reprime la diferenciación temprana de los osteoblastos debido al silenciamiento del gen *NPNT*, gen que codifica para la nefronectina, inductor de la osteogénesis (207). Finalmente, mir-378 se ha visto que regula la diferenciación osteogénica mediante el gen *bone morphogenetic protein 2 (BMP2)*. Este gen es un factor de transcripción que induce la transformación de hueso y cartílago (206). Los niveles anormales de BMP2 causan anomalías congénitas y enfermedades en las que están implicadas las células mesenquimales que se diferencian a hueso, cartílago, músculo y grasa (208). En nuestro estudio, el genotipo GG de rs702742 en mir-378h podría conllevar a la sobre-expresión de mir-378h afectando a la actividad de los osteoblastos mediante alguna de las vías previamente

comentadas; por lo que el SNP rs702742 en mir-378h podría ser un SNP importante en la osteosarcomagénesis.

El siguiente SNP que resultó significativo fue rs10422347 en mir-4745, donde el genotipo TT+CT aumentó el riesgo de OS (OR=2,30). Hasta el momento en la literatura, no se han descrito dianas para este miRNA. Se transcribe desde el séptimo intrón del gen *polypyrimidine tract binding protein 1 (PTBP1)*, implicado en el mecanismo de splicing (209). Este gen ha sido relacionado con cánceres como el glioblastoma (210), donde *PTBP1* altera el *splicing* de la enzima piruvato kinasa, la que a su vez altera el metabolismo de la glucosa, contribuyendo al efecto *Warburg* observado en las células cancerosas (glicolisis anaerobia) (211, 212). Mediante análisis *in silico*, observamos que el alelo T de este polimorfismo crea nuevos sitios de unión a factores de transcripción como GATA-1 y GATA-2, lo que podría alterar el splicing de la piruvato kinasa afectando al metabolismo de la glucosa en OS.

Finalmente, se encontró asociación entre el SNP rs35770269 y el riesgo a desarrollar OS, donde el alelo T era de protección (OR= 0,64). El SNP rs35770269 está localizado en la región *seed* de mir-449c, lo que podría afectar a la unión con sus dianas. De hecho, mediante análisis *in silico* se comprobó que el alelo rs35770269-T (de riesgo) modificaba la estructura secundaria de mir-449c (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/miRNASNP2/>), alterando la complementariedad con sus dianas. El mir-449c forma parte de un *cluster* de miRNAs altamente conservado, que pertenece a la familia de mir-34 por su similitud con la secuencia *seed* (213). Se ha demostrado que la familia mir-34 participa en el proceso de osteosarcomagénesis, ya que todos sus miembros inducen la diferenciación de los osteoblastos durante el desarrollo del hueso (105, 214). Dos estudios en OS, han encontrado asociación entre mir-SNPs de la familia mir-34 y la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. Específicamente, rs4938723- T, localizado en la región promotora del pri-mir-34b/c y rs72631823-A, localizado en el pre-mir-34a, aumentaron el riesgo de OS en población china (109, 110). En éste último, se comprobó en líneas celulares de OS, que el alelo de riesgo (A) provocaba una disminución de la expresión de mir-34a, alterando la unión con su diana c-MET, lo que dio lugar a un aumento de la proliferación celular. Hoy en día se sabe que los miRNAs de la misma familia suelen compartir genes dianas, por lo que es esperable que mir-34 y mir-449 tengan las mismas dianas. En este sentido, podemos hipotetizar que el alelo rs35770269-T en mir-449 se comporte del mismo modo que rs72631823-A en mir-34a, alterando la unión con c-MET.

En la población eslovena, el resultado más interesante fue la asociación encontrada entre dos SNPs localizados en mir-5189 (rs35613341 y rs56292801) y el riesgo de OS. El SNP rs35613341, situado en el pre-miRNA, superó la corrección por Bonferroni ($p=0,0001$). En ambos SNPs, los valores significativos se debieron a una fuerte disminución de los heterocigotos en los casos. Esta pérdida de heterocigosidad sugiere la existencia de una deleción en la zona. De hecho, la región donde se encuentra localizado el mir-5189 es una CNV frecuentemente delecionada (datos DGV (*Database of Genomic Variation*)). Ésta es la primera vez en la que la deleción 16q24 ha sido asociada con un incremento del riesgo a desarrollar OS.

El SNP rs2070960 de mir-3620 también se asoció con el riesgo a desarrollar OS, donde el genotipo TT confería protección. Resulta interesante remarcar que este miRNA se localiza en el segundo intrón del gen *ADP-ribosylation factor 1 (ARF1)*, el cual codifica para una GTPasa con un crítico papel en la proliferación celular (215). Se ha observado que ARF1 controla la proliferación celular mediante la regulación de la actividad pRB/E2F1 en células de cáncer de mama (216). Del mismo modo, rs2070960 podría modular la expresión de ARF1 en OS, alterando la proliferación celular. De hecho, mediante análisis *in silico* se observó que el alelo T crea nuevos sitios de unión para los factores de transcripción CP2 y P (F-SNP), lo que podría alterar la expresión del gen.

El SNP rs2273626 de mir-4707 también resultó significativo en la población eslovena, donde el genotipo AC+CC aumentó el riesgo de OS (OR=5,01). Este SNP se mantuvo significativo en la población conjunta. Hasta el momento, no se han establecido qué genes están regulados por mir-4707. No obstante, este miRNA se localiza en la región 5'UTR del gen *HAUS augmin-like complex, subunit 4 (HAUS4)*. Este gen codifica para una subunidad del complejo del centrosoma denominado augmina, componente necesario para el agrupamiento del centrosoma. Concretamente, esta subunidad se localiza en el huso mitótico por lo que, podría participar en el ensamblaje mitótico y mantenimiento de la integridad del centrosoma durante la división celular (217). En OS, el genotipo AC+CC del SNP rs2273626 podría modificar los niveles de expresión del gen *HAUS4*, alterando la división celular en OS.

El SNP rs9877402 de mir-5682 también se asoció con el riesgo de OS. Está situado en la región pre-madura del miRNA, lo que *a priori* podría alterar los niveles de expresión del miRNA maduro. Sin embargo, no se conocen los genes que regula. Mir-5682 está localizado en el cuarto intrón del gen *syntaxin binding protein 5-like (STXBP5L)*, también llamado tomosina 2 que codifica para proteínas transmembrana que participan en la exocitosis (217). Es sabido

que los miRNAs se transportan a través de vesículas o exosomas al exterior de la célula (218, 219), por lo que es de esperar que alteraciones en la familia de las tomosinas afecten al transporte de los miRNAs vía vesículas. Apoyando esta idea, se han observado alteraciones en la expresión de genes de la familia de las tomosinas en OS metastásico, lo que potencialmente podría desestabilizar la membrana plasmática de las células de OS (220) y alterar la exocitosis de los miRNAs. Por ello pensamos que rs9877402 podría alterar la expresión del gen *STXBP5L* modificando la regulación de la exocitosis.

Otros resultados significativos fueron los encontrados en los SNPs rs4674470 en mir-4268, rs6726779 en mir-4431 y rs243080 en mir-4432. Sin embargo, su asociación con OS no pudo ser explicada.

Otro resultado interesante de la población eslovena fue la asociación encontrada entre el SNP rs3746444 en el pre-mir-499 y el riesgo a desarrollar OS. El alelo G de este SNP se asoció con un aumento del riesgo (OR=6,71). Rs3746444 es uno de los polimorfismos más estudiados en miRNAs. Ha sido asociado con el riesgo a desarrollar diversos tipos de cáncer (221-225). Además, en línea con nuestros resultados, dos meta-análisis han sugerido que el alelo G reduce el riesgo a desarrollar cáncer en población caucásica (226, 227). Sin embargo, ésta es la primera vez que se asocia este SNP con el riesgo de OS. Rs3746444 está situado en la región premadura del mir-499-5p y en la región *seed* de mir-499-3p. Las posibles dianas de estos miRNAs son *RECQL* y *RB1*, respectivamente (186). Ambos genes están implicados en la reparación y estabilización del genoma. Tal y como se ha comentado anteriormente, el gen *RB1* está alterado en aproximadamente el 35% de los OS esporádicos, mientras que *RECQL* está alterado en tres de los síndromes de predisposición hereditaria al cáncer con mayor riesgo de OS (Síndromes RTS, Werner y Bloom). Específicamente en población eslovena, el alelo de protección G podría provocar la sobre-expresión de mir-499, quien a su vez disminuiría la expresión de estos genes, que inactivados, parecen estar implicados en la susceptibilidad del OS.

Al sumar los datos de las dos poblaciones, encontramos tres nuevos SNPs significativamente asociados con el riesgo a desarrollar OS (rs2910164, rs4112253 y rs67042258). En estos 3 SNPs las dos poblaciones presentaban la misma tendencia, por lo que al aumentar el tamaño muestral aumentó el poder estadístico, encontrando resultados significativos.

De los tres SNPs el resultado más interesante fue la asociación encontrada en rs2910164 del mir-146a donde el CG+CC confería protección (OR=0,58), por lo que, el genotipo GG confería riesgo. Este polimorfismo ha sido ampliamente estudiado y ya se han realizado varios MA en los que se ha encontrado asociación con carcinoma hepatocelular (228) y cáncer gástrico (229, 230). En OS, este polimorfismo fue analizado por LV H y cols, no encontrando asociación ($p=0,1$) (110), pero sí tendencias de riesgo en GG, lo que apoya nuestro resultado. Esta diferencia de resultados podría deberse a diferencias poblacionales (este estudio se realizó en población china). Rs2910164 está localizado en la hebra 3p de miR-146. El alelo C conlleva a la disminución de la producción de mir-146 maduro (231). Uno de los posibles genes diana de este miRNA es el gen *TNF receptor associated factor 6* (TRAF6), que se ha visto regula la capacidad de proliferación, apoptosis e invasión de las células de OS en líneas celulares (232).

Otro resultado interesante fue el detectado en el SNP rs4112253 de mir-4752. Mir-4752 no tiene genes diana conocidos. El SNP se localiza también en el primer intrón del gen *leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A member 6* (LILRA6), situado en 19q13.4. Este gen forma parte de un *cluster* de receptores de leucocitos sujeto a múltiples CNVs y CNAs (233). Específicamente en OS, ya se han descrito CNAs (amplificaciones) en esta región (234-236).

Finalmente, el tercer nuevo SNP significativo en la población conjunta fue rs67042258, localizado en mir-6128 y cuyas dianas aún no están descritas. Mir-6128 se sitúa en la región 5' del gen *olfactory receptor, family 9, subfamily G, member 4* (OR9G4) localizado en la región 11q12.2. Por el momento, el papel de este gen en la susceptibilidad a OS es desconocido. En otro tipo de tumores, sí se ha observado la sobreexpresión de genes de la familia de OR9G4 (237, 238), provocando la inhibición *in vitro* de la proliferación celular en cáncer de próstata (239, 240).

En resumen, esta es la primera vez que se realiza un estudio tan extensivo de SNPs en pre-miRNAs en relación con la susceptibilidad a desarrollar OS. En este estudio se detectaron un total de 26 SNPs en 25 miRNAs que podrían estar implicados en la susceptibilidad del OS. El resultado más destacable se encontró en la población española, en la que 4 polimorfismos en 4 miRNAs del *cluster* de la región 14q32 se asociaron con el riesgo de OS, *cluster* que regula MYC y cuya desregulación ya ha sido asociada al OS. Estos resultados indican un posible *hotspot* de susceptibilidad del OS. Con respecto a la población eslovena, encontramos una

delecion en la región 16q24 asociada con un incremento del riesgo a desarrollar OS. En este estudio se encontraron también variantes significativas en mir-499 y mir-146a que ya habían sido asociadas con otros cánceres. Otro resultado interesante fue que al analizar las dos poblaciones conjuntamente, aumentamos el poder estadístico, y por ello, encontramos nuevos marcadores de riesgo en mir-146a, mir-4752 y mir-6128. Estos resultados nos llevan a pensar que estos 3 polimorfismos en miRNAs funcionan como posibles marcadores de susceptibilidad de OS a nivel poblacional.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Tras el estudio de asociación en nuestras poblaciones y posterior MA de las variantes genéticas en el gen *MDM2*, rs1690916 y rs2279744, no confirmamos la asociación con el riesgo a desarrollar OS. Por tanto, estas variantes no deberían de considerarse como marcadores de susceptibilidad en OS.
2. En el caso del SNP rs231775 en el gen *CTLA4*, confirmamos los resultados de los estudios previos. Por lo tanto, el SNP rs231775 en el gen *CTLA4* podría ser considerado marcador de susceptibilidad en OS.
3. Nuestros resultados refuerzan la importancia de la función del complejo RISC en la susceptibilidad del cáncer ya que, hemos encontrado variantes genéticas en tres genes de este complejo (rs11866002 en *CNOT1*, rs3812265 en *CNOT4* y rs3823994 en *SND1*) asociadas con la susceptibilidad a desarrollar OS.
4. Nuestro resultados apoyan la idea de que la región 14q32 es un *hotspot* de la susceptibilidad a desarrollar OS. Esto puede ser debido, en parte, a variantes genéticas en miRNAs de este *cluster* cuya función es regular el oncogen *MYC* en OS.

Los resultados encontrados destacan el interés de los ncRNAs en la susceptibilidad a desarrollar OS juvenil. Se abre un interesante campo de estudio que ayudará a entender mejor la biología de esta patología y por tanto, su prevención y/o tratamiento.

**Osteosarkoma pediatrikoaren suszeptibilitatean inplikatur
dauden aldaera genetikoak**

Laburdurak

%95KT	%95ko konfidantza-tartea
3'UTR	Itzultzen ez den genearen 3'gunea
5'UTR	Itzultzen ez den genearen 5'gunea
aa	Aminoazidoa
AEB	Estatu Batuak
Ala	Alanina
AM	Kontrolatan maiztasunik txikiena duen aleloa
AMM	Alelo minimoaren maiztasuna
AP1	<i>Activator protein 1 transcription factor genea</i>
ARID5B	<i>AT rich interactive domain 5B genea</i>
ARMS-PCR	<i>Amplification Refractory Mutation System-Polymerase chain reaction</i>
ASO	Hasle alelo espezifikoa
BMP2	<i>bone morphogenetic protein 2 genea</i>
bp	Base pare
C9orf3	<i>Chromosome 9 open reading frame 3 genea</i>
CCNE1	<i>Cyclin E1 genea</i>
CDK4	<i>Cyclin-dependent kinase 4 genea</i>
CEBPE	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), epsilon genea</i>
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
c-MET	<i>MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase genea</i>
CNOT1	<i>CCR4-NOT transcription complex, subunit 1 genea</i>
CNOT2	<i>CCR4-NOT transcription complex, subunit 2 genea</i>
CNOT3	<i>CCR4-NOT transcription complex, subunit 3 genea</i>
CNOT4	<i>CCR4-NOT transcription complex, subunit 4 genea</i>
CNOT5	<i>CCR4-NOT transcription complex, subunit 5 genea</i>
CNOT6	<i>CCR4-NOT transcription complex, subunit 6 genea</i>
CNV	Kopia kopuru aldaerak
COL1A1	<i>Collagen, type I, alpha 1 genea</i>
CSMD3	<i>CUB and Sushi multiple domains 3 genea</i>
CTLA4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 genea</i>
de	Desbiderapen estandarra
DGCR8	<i>DGCR8 microprocessor complex subunit genea</i>
DGV	Database of Genomic Variation
DICER	<i>Dicer 1, ribonuclease type III genea</i>
DNA	Azido desoxirribonukleikoa
Dom	Dominantea
DROSHA	<i>Drosha, ribonuclease type III genea</i>
dsRNA	Harizpi bikoitzeko RNA
E2F1	<i>E2F transcription factor 1 genea</i>
EE	Ez eskuragarria
EIF2C1	<i>Gen eukaryotic translation initiation factor 2C, 1 genea</i>
EIF2C2	<i>Gen eukaryotic translation initiation factor 2C, 2 genea</i>
ENCODE	DNA elementuen entziklopedia
Erref	Erreferentzia
Errez	Errezesiboa
F	<i>Forward</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
Fr	Maiztasun alelikoa
GENIM3	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 20 genea</i>

<i>GENIM4</i>	<i>Gem (nuclear organelle) associated protein 4</i> genea
<i>GENIM5</i>	<i>Gem (nuclear organelle) associated protein 5</i> genea
<i>GH1</i>	<i>Growth hormone 1</i> genea
GK	Gune kromosomikoa
Gln	Glutamina
<i>GRM4</i>	<i>Glutamate receptor, metabotropic 4</i> genea
GWAS	genoma osoko aldaera genetikoan azterketa
<i>HIWI</i>	<i>Piwi-like RNA-mediated gene silencing 1</i> genea
HWO	Hardy-Weinberg oreka
<i>IGF1</i>	<i>Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)</i> genea
<i>IGF2R</i>	<i>Insulin-like growth factor 2 receptor</i> genea
<i>IKZF1</i>	<i>IKAROS family zinc finger 1</i> genea
Ile	Isoleuzina
ISCI	Instituto de Salud Carlos III
JUND	jun D proto-onkogena
Kod	Kodominantea
Log	Log-aditiboa
LOH	Heterozigositate-galera
<i>LSAMP</i>	<i>Limbic system-associated membrane protein</i> genea
LSO	Hasle lokus espezifikoa
M	miRNA heldua
MA	Meta-analisisa
<i>MDM2</i>	<i>MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase</i> genea
miRISC	RISC konplexua eta miRNA multzoa
miRNAk	mikroRNAk
mir-SNP	Pre-miRNA/miRNAtan dauden SNP
mRNA	RNA mezulariaren
MYC	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homologue (avian)</i> genea
<i>NBN</i>	<i>Nibrin</i> genea
ncRNA	RNA ez kodetzailea
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NPNT	<i>Nefronectin</i> genea
OME	Osasunaren Mundu Erakundea
OR	Odds ratio
OS	Osteosarkoma
<i>PCR-RFLP</i>	Errestrikzio entzimen bidezko PCR anplifikazioa
PE	Gure azterketa
PM	miRNA pre-heldua
pRB	Erretinoblastomaren proteina
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses
PTBP1	<i>Polypyrimidine tract binding protein 1</i> genea
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> genea
R	Reverse
<i>RAN</i>	<i>RAN, member RAS oncogene family</i> genea
<i>RB1</i>	<i>Retinoblastoma 1</i> genea
<i>RECQL4</i>	<i>RecQ protein-like 4</i> genea
RISC	<i>RNA-inducing Silencing</i> konplexua
<i>RUNX2</i>	<i>Runt-related transcription factor 2</i> genea
SF1	<i>Splicing factor 1</i> genea
SGIKER	Euskal Herriko Unibertsitateko Zerbitzu Orokorrak
<i>SND1</i>	<i>Staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1</i> genea
SNP	Nukleotido bakarreko aldaketa

ssRNA	Kate bakuneko RNA
TARBP2	<i>TAR (HIV-1) RNA binding protein 2</i> genea
TBE	Tris/Borato/EDTA disoluzioa
TGFBR1	<i>Transforming growth factor, beta receptor 1</i> genea
Thr	Treonina
<i>TNRC6A</i>	<i>Trinucleotide repeat containing 6A</i> genea
<i>TNRC6B</i>	<i>Trinucleotide repeat containing 6B</i> genea
<i>TP53</i>	<i>Tumor protein p53</i> genea
TRAF6	<i>TNF receptor associated factor 6</i> genea
Val	Balina
<i>VEGFA</i>	<i>Vascular endothelial growth factor A</i> genea
W	Pisua meta-analisan
<i>XPO5</i>	<i>Exportin 5</i> genea
ZAA	Zelula antigeno-aurkezlea
ZAM	Zelula ama mesenkimalak
ZAT	Zelula ama tumoralak

Aurkibidea

<i>SARRERA</i>	<i>241</i>
OSTEOSARKOMA	243
Gaixotasunaren ezaugarri nagusiak	243
Epidemiologia	243
Faktore pronostikoak eta tratamendua	244
Tumorearen ezaugarriak	244
Ezaugarri histopatologikoak	245
Ezaugarri genetikoak	245
Etiologia	247
Osteosarkomaren suszeptibilitatearen genetika	248
Gene kandidatoen bidezko azterketa	251
Genoma osoko azterketak	252
GUNE EZ KODETZAILEAK	256
miRNAk	257
miRNAen prozesamendu geneak eta minbizia	261
miRNAk eta minbizia	262
<i>HIPOTESIA ETA HELBURUAK</i>	<i>265</i>
HIPOTESIA	267
HELBURUAK	269
<i>MATERIAL ETA METODOAK</i>	<i>271</i>
PAZIENTEAK	273
OSREN ARRISKUAREKIN ASOZIATURIKO SNPak	275

OSren suszeptibilitatearekin asoziatutako geneen hautaketa.....	275
<i>MDM2</i> genearen rs1690916 SNParen genotipazioa.....	275
<i>MDM2</i> genearen rs2279744 SNParen genotipazioa.....	278
<i>MDM2</i> genearen rs1690916 eta rs2279744 SNPen meta-analisia	280
<i>CTLA4</i> genearen rs231775 SNParen genotipazioa	284
<i>CTLA4</i> genearen rs231775 SNParen meta-analisia	284
MIRNA GENEKIN ERLAZIONATUTAKO SNPAK.....	285
OSren suszeptibilitatean adierazpen aldaketa duten miRNA bilaketa .	285
MiRNA prozesamendu geneen SNPen azterketa.....	286
MiRNA prozesamendu geneen SNP-hautaketa.....	286
MiRNA prozesamendu geneen SNPen genotipazioa.....	289
MiRNA geneen SNPen azterketa.....	290
MiRNA geneen SNP-hautaketa.....	290
MiRNA geneen SNPen genotipazioa.....	291
MiRNAen bigarren mailako egituraren <i>in silico</i> analisia.....	292
ANALISI ESTATISTIKOAK.....	292
<u>EMAITZAK</u>	<u>295</u>
OSREN SUSZEPTIBILITATEAREKIN ASOZIATUTAKO SNPEN BALIDAZIOA .	296
<i>MDM2</i> genearen SNPen asoziazio analisia.....	296
<i>MDM2</i> SNPen bilaketa bibliografikoa eta meta-analisia.....	303
<i>CTLA4</i> genearen SNPen asoziazio analisia.....	311
<i>CTLA4</i> SNPen bilaketa bibliografikoa eta meta-analisia.....	314
MRNAEKIN ERLAZIONATUTAKO GENEEN SNPEN AZTERKETA	317
OSren suszeptibilitatean adierazpen aldakorreko miRNAen bilaketa ..	317
MiRNAen prozesamendu geneen SNPen asoziazio analisia	319
MiRNA geneen SNPen asoziazio analisia.....	322

<u>EZTABAIDA</u>	<u>333</u>
MDM2 GENEAREN AZTERKETA.....	336
CTLA4 GENEAREN AZTERKETA.....	339
MIRNAEKIN ERLAZIONATUTAKO GENEEN AZTERKETA	341
MiRNA prozesamendu geneen SNPen azterketa	341
MiRNA geneen SNPen azterketa	344
<u>AZKEN HAUSNARKETAK</u>	<u>353</u>
<u>REFERENCIAS/ERREFERENTZIAK</u>	<u>355</u>

SARRERA

OSTEOSARKOMA

1.1 GAIKOTASUNAREN EZAUGARRI NAGUSIAK

Osteosarkoma (OS) edo sarkoma osteogenikoa lehen mailako hezur-minbizirik arruntena da, %20ko maiztasuna baitu lehen mailako minbizien artean (1, 2). Hezur-muinean sortzen den tumorea da eta berau osatzen duten zelula neoplasikoek hezur-ehuna suntsitzen dute eta osteoidea deitzen den heldubako hezurra ekoizten dute (3).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

OS lehen mailako hezur-minbizirik ohikoena da, 4-5 kasu/milioi biztanlerik behin gertatzen da. Adin-talde guztietan eman daiteken arren, gaztetan gertatzen da batez ere. Izan ere, kasuen %70a 40 urte baino gazteagoak dira. Azken hamarkadetan gaixotasunaren intzidentzia areagotu da emakume gazteagoen artean.

Orohar, OS gizonezkotan maiztasun handiagoa du emakumezkotan baino, 1,35:1 proportziotan (3). Parkinek eta kolaboratzaileak argitaratutakoaren arabera Europa hegoaldean OS pediatrikoek intzidentzia handiagoa dute (4). Haurren tumoreen erregistro nazionalaren arabera, 0 eta 15 urtetan Espainian 32 eta 36 kasu diagnostikatzen dira urtean (<http://www.uv.es/rnti/cancerinfantil.html>).

Gaixotasuna gaztaroan gertatzen denean pubertaroko aldaketekin eta hezurren hazkundeak zerikusia dutela uste dute (5, 6). Gaixotasun hau hirugarren adinean gaixotasun sarritan gertatzen da, alabaina, bere jatorria beste hezur gaitzek, Paget gaixotasuna esaterako (OS kasuen %1) eta irradiazioak (OS kasuen %4) zerikusia dutela uste dute.

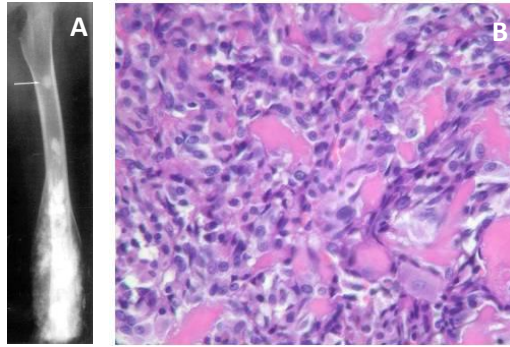
1.3 FAKTORE PRONOSTIKOAK ETA TRATAMENDUA

OS gaixotasun agresiboa da eta maiz heriotza dakar garaiz tratatzen baldin ez bada. Tratamedu estandarra, farmako antineoplasikoak (doxorubizina, karboplatinoa, ifosfamida eta metotrexatoa) eta kirurgia konbinatzean datza, tumorea eta metastasiak txikitu eta mozteko (7). Estrategia terapeutiko hauek bost urteko biziraupen-tasa %50 eta %70 artean izatea lortu dute OS lokalizatuetan. Alabaina, OS metastasikoen kasuan (pronostiko larria) biziraupena %20 da.

Tumorearen tamainua, bolumena, kokapena (mutur proximalean edo hezurdura axialean kokatuta dagoenean) eta kirurgia aurreko kimioterapiaren erantzun eza larria pronostikoa okerragotu dezakete (3).

1.4 TUMOREAREN EZAUGARRIAK

OSren jatorria hezur-hazkunde arina eta hezur luzetako muturretan gertatzen da batez ere, femurraren alde distalean, tibia eta humeroaren alde proximalean (1.a Irudia). Nahiz eta hezur luzetan OS garapena maizagoa izan hezur laburretan ere gertatzen da (adib. pelbis, bizkarrezur eta garezurrean) batez ere, adineko kasuetan (3).



1. irudia. A) Femurraren OS erradiografia (3). B) Nukleoaren itxura atipikoa eta osteoidea ekoizten duten zelula fusiforme anitzen populazioa-tindaketa eosinofiloan (8).

1.4.1 Ezaugarri histopatologikoak

Maila histologikoan zelula osteoblastiko fusiforme gaiztoak bereizten dira. Zelula hauen ezaugarri nabarmenena osteoidea ekoizteko ahalmena da. Osteoidea, hezur-zelula eta hezur-matrize (ekoiztuberria, kaltzifikatugabekoa eta osteoblasto aktiboen alboan dagoena) ez mineralizatua duen ehuna da. Bestalde, OS azpimota histologikoak daude tumorearen ezaugarri (itxura, hazkundera eta hedatze-ahalmena), zelula hauen gaiztotasun maila (gradu altua eta baxua) eta kokapenaren arabera. Azkenik, Osasunaren Mundu Erakundeak (OME) tumorearen kokapenean oinarrituz 12 tumore osteogeniko bereizten ditu. Hauen artean ugariena, (%80) OS konbentzionala da eta tumorea muineko barrunbetan kokatzen delako bereizten da (9). Gainera, OS mota azpimota honetan osteoidea ehun mota ezberdinekin nahasita egon daiteke: ehun zuntzuarekin eta ehun kartilaginosoarekin. Hori dela eta, OME-k hiru OS konbentzional azpimota definitu zituen bere matrizea osatzen duten materialen arabera: OS osteoblastikoa (osteoidea soilik)(76-80%), OS kondroblastikoa (osteoidea ehun kartilaginotsuarekin) (10-13 %) eta OS fibroblastikoa (osteoidea ehun zuntzuarekin) (10 %) (3). Ezaugarri histologiko ezberdinak aurkeztu arren, portaera klinikoa eta tratamendua beretsua da azpitalde hauetan.

1.4.2 Ezaugarri genetikoak

Genetikaren ikuspuntutik, OS konbentzionalak aberrazio kromosomiko anitz (zenbakizkoak eta egiturazkoak) duen kariotipo konplexua aurkezten du. Hala ere, oraindik ez da aberrazio kromosomiko zehatzik aurkitu tumore honetan. Hala ere, azido desoxierribonukleotido (DNA) tumoralean, zenbait gunetan anplifikazio eta kopia kopuru

aldaeren (*copy number variation*, CNV) irabaziak (1p36, 1q21-22, 6p12-21, 8q21-24, 12q11-14, 17p11-13 eta 19q12-13) eta galerak (3q13, 8p21, 9p13 eta 13q14) sarritan topatu dira hibridazio genomiko konparatuko (*comparative genomic hybridization*, CGH) array-en bidezko ikerketa ezberdinetan (3). Gune hauetan osteosarkomagenesian parte-hartze biologiko zuzena azaldu dezaketen gene ugari kokatzen dira. Adibidez, 3q13 zonaldean delezio edo heterozigositate-galerak (*loss of heterocycosity*, LOH) gertatzen dira eta bertan, *limbic system-associated membrane protein (LSAMP)* genea kokatuta dago. Gene honen adierazpena OS-ren progresio eta biziraupen okerraren adierazlea dela ikusi dute (10). Bestalde, 6p12-21 eremu kromosomikoan anplifikazioa topatu ohi da tumoreen %40-50 kasuetan. Eremu honetan, *runt-related transcription factor 2 (RUNX2)* genea (diferentziazio osteoblastikoaren arduradunetako bat (11) eta *vascular endothelial growth factor A (VEGFA)* genea (angiogenesisian parte hartzen du) (12) kokatzen dira. Azkenik, tumore hauen %45-55etan anplifikazioak eta irabaziak behatu dira 8q21-24 eremu kromosomikoan non *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog* onkogena (*MYC*) kokatuta dagoen (13-15).

Gene mailan, DNAren konponketarekin erlazioa duten geneek eta ziklo zelularreko geneek ere aldaera genetikoak dituzte OS esporadikoetan. Genomaren egonkortze eta konponketa prozesuan diharduten geneen artean erretinoblastomaren genea (*RB1*) 13q14 eremu kromosomikoan eta p53 gene-tumore ezabatzailea (*TP53*) 17p13.1 eremu kromosomikoan azpimarragarrienak dira hurrenez hurren (16-18). Gene hauetan LOH eta delezio fenomenoak maiz topatzen dira, eta hori dela eta, geneak inaktibatzen dira OS esporadikoen %35 eta %40an, hurrenez hurren. Maiztasun txikiagoan, tumoreen %10an alegia, *MDM2* protoonkogenean (*TP53* genearen antagonista) anplifikazioak behatzen dira eta *RecQ protein-like 4* genea (*RECQL4*) %5etan mutazioak (18, 19). Ziklo zelularreko genei dagokiela, *CDK4* genea 12q13-14 eremuan eta *CCNE1* genea 19q12 eremuan, biak ziklinak, anplifikazioak behatu zaizkie tumoreen %10an (20, 21).

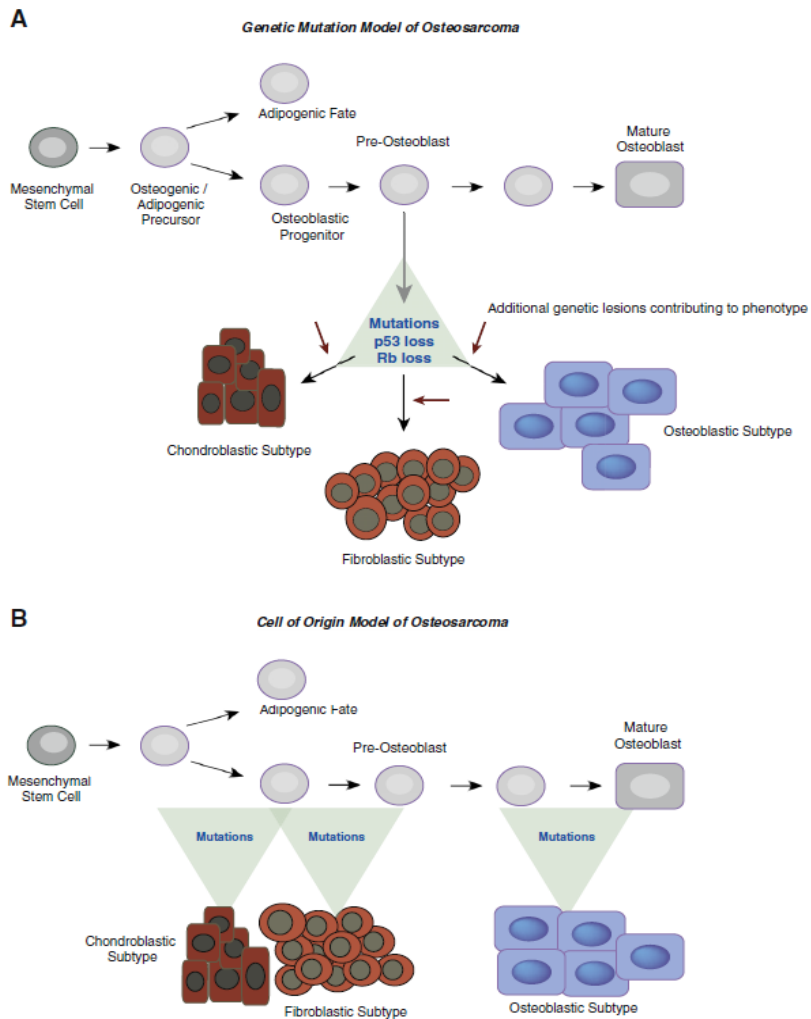
Duela gutxi, gainera, *Next Generation Sequencing* (NGS) edo sekuentziazio masibo bidezko ikerketetan OS tumore-ehunen genomaren *chromotripsis* (kromosomen errauspena) deitzen den mekanismo genetiko berria behatu da, OSren garapenarekin erlazionatua. Fenomeno hau kromosoma osoan zein beso baten CNV eta LOH-ak txandakatzen dituelako ezagutzen da (22). Hori dela eta, mekanismo hau OS esporadikoen garapenean inplikaturik dagoela ematen du (23).

1.5 ETIOLOGIA

Zenbait arrisku faktore deskribatu dira OS jatorrian: ingurune-faktoreak (aurretiko trauma, bai erradioterapia bai kimioterapia jaso izana eta hezur-lesio onberak) eta faktore genetikoak (heredatutako mutazioak eta somatikoak).

OS azkar berriztaten diren hezur-ehunetan maiz agertzen da. Gune hauetan, hezur-eta kartilago-zelulak zelula ama mesenkimaletatik (ZAM) azkar ezberdintzatzen dira eta hori dela eta, mutazioak gertatzeko joera dagoenez, zelula ama tumoraletara (ZAT) ezberdintzatuko dira (24).

Egun, bi teoria daude OSren sorrera azaltzeko. Lehengo teoriaren arabera, osteoblasto aitzindaritik heldurako ezberdintzapen-prozesuko urrats ezberdinetan mutazioak gertatzen direla aldarrikatzen du (25). Prozesu honetan, mutazioak gertatzen diren urrats ezberdinetan azpimota histologikoak (kondroblasto, fibroblasto eta osteoblastikoa) eratorriko litzateke. Bigarren teoriak dioen moduan, mutazioak osteoblasto aitzindari bakarrean gertatuko litzateke eta ondorioz, azpimota histologiko guztiak aitzindari honetatik eratorriko litzateke (26) (2.irudia).



2. irudia. OSren sorrera azaltzeko teoriak (27).

1.6 OSTEOSARKOMAREN SUSZEPTIBILITATEAREN GENETIKA

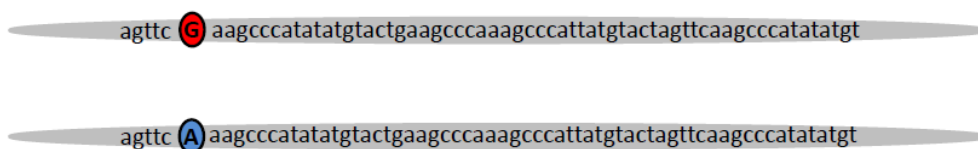
OSren sorrera horren kasu gehienetan gaztaroan izatean gaixotasun honen jatorria aldagai genetiko garrantzitsua egotea adierazten du. Gainera, OSren arriskua handiagoa da minbizi heredagarria duten zenbait sindrometan: Li-Fraumeni sindromean, Erretinoblastoma heredagarrian, Rothmund-Thomson sindromean, Bloom eta Werner-ren sindromean eta Diamond Blackfan-en sindromean (1. taula). Sindrome hauek DNAREN konponketan eta mantentzean diharduten genetan penetrantzia osoa duten mutazioak eragiten dituzte (28).

1. taula OS-ren sorrerarekin erlazionatutako minbizi heredagarria duten sindromeak ((28) moldatuta).

Sindromea	Genea
Li-Fraumeni	<i>TP53</i>
Retinoblastoma	<i>RB1</i>
Rothmund Thomson	<i>REQL4</i>
Werner	<i>WRN</i>
Bloom	<i>BLM</i>
Diamond Blackfan	Proteina erribosomikoak

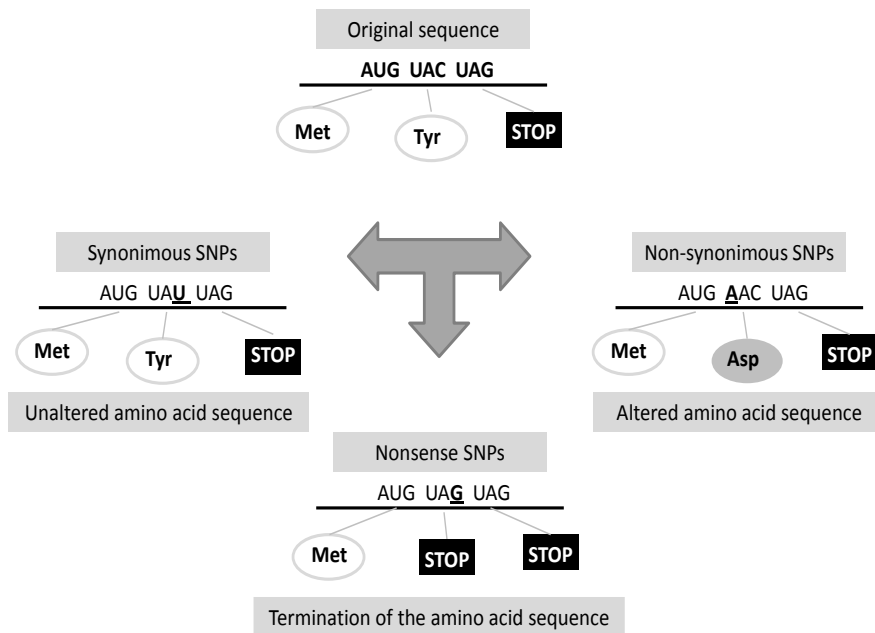
Sindrome hauek nahiko arraroak eta OS kasu guztien %5a bakarrik osatzen dute (1). Izan ere, kasu gehienak OS esporadikoak dira.

Oro har, Osa gaztaroan gertatzen den gaixotasuna da, beraz, aldagai genetiko indartsuagoa izan dezakela uste da. Halere, oraindik ez da topatu gaixotasuna eragin dezaken predisposizio generik. Hainbat ikerketek proposatu dute modu ahulean jokatzeko duten eta penetrantzia ez-osoan duten aldaera genetikoak OSren jatorrian eragiten dutela (28), hortaz, efektu txikien batuketara behar da gaixotasunaren suszeptibilitatean eragiteko.

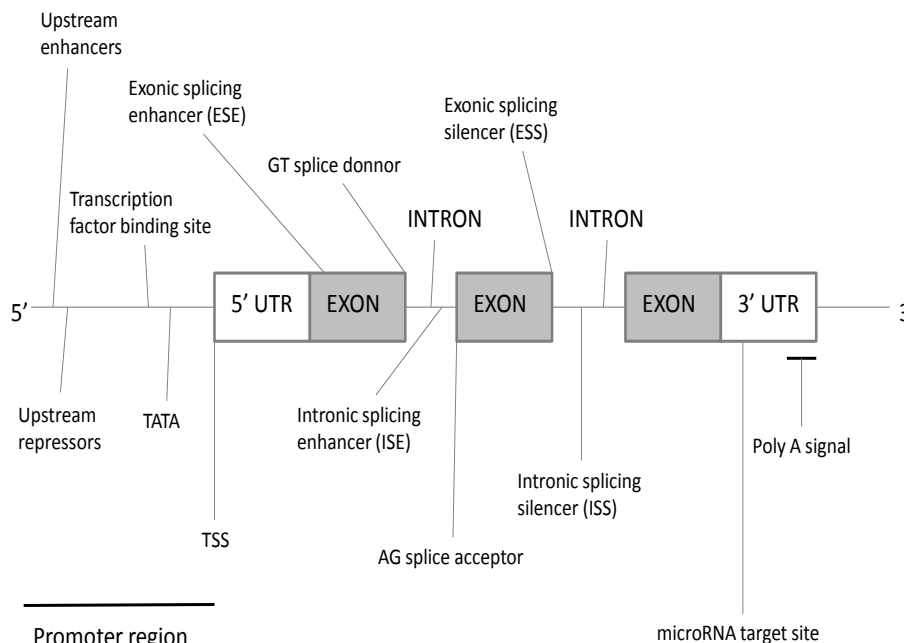


3. irudia. SNP baten adibidea. Bi kromosoma adierazi dira eta SNPa dagoen gunean aleloak adierazi dira kromosoma bakoitzean.

Nukleotido bakarreko aldaketak edo, *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) aldaera genetikorik arruntenetarikoa da (3. Irudia). Genoman alelo txikiaren maiztasuna %1a baino handiagoa duen 10 milioi SNP daudela estimatzen da eta giza genomaren %90ren aldakortasun genetikoa azaltzen du (28). SNPak bere kokapenaren arabera, proteinaren sekuentzian eragin (exoian edo moztitsasketa lekuan) edo genearen erregulazioan (promotorea, RNA ez kodetzailean (ncRNA) eta UTR eskualdea) (4.irudia).



A)



4. irudia A) Exoien aminoazidoen sekuentzian dauden SNPen efektu funtzionala. B) Bestelako efektua izan dezaketen SNPak.

Aldaera genetiko arruntak minbiziaren suszeptibilitatean eragin dezaketela frogatu dute ikerketa lan askok. Zehazki, minbizi pediatrikoetan, esaterako leukemia linfoblastiko akutuan, aldakortasun genetikoaren %25a *ARID5B*, *IKZF1*, *PIP4K2* eta *CEBPE* genetan dauden aldaera genetiko arruntei dagokiela uste da (29).

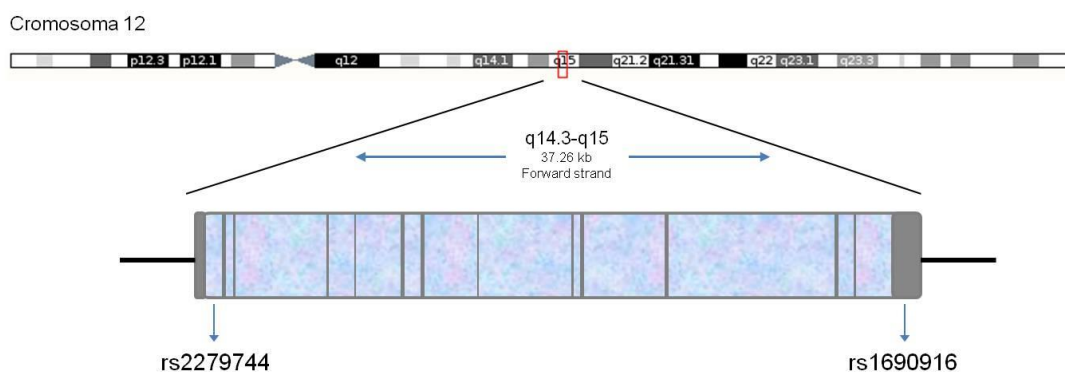
OSren kasuan, SNPen inplikazioa ikertzeko estrategia bi erabili dira: gene kandidatoen bilaketa bidezkoa eta genoma osoaren ikerketa bidezkoa.

1.6.1 Gene kandidatoen bidezko azterketa

Gene kandidatuaren estrategia *a priori* OSren biologiarekin inplikaturik egon daitezkeen geneen hautespenean oinarritzen da. Hori dela eta, mota hauetako azterketen emaitzek azalpen nahiko erraza izaten dute, alde aurreko hipotesi batean oinarritzen baitira.

Orain arte, OSri dagokiola, 37 gene kandidatuaren azterketa gauzatu dira 283 gene eta 5250 SNP analizatuz (1. Taula osagarria). Gene gehienak ikerketa lan bakarrean aztertu ziren (n=250). Bakarrik 10 gene bi ikerketa lan baino gehiagotan aztertu ziren. Hamar gene hauetatik bost genetean (*IGF2R*, *TGFBR1*, *COL1A1*, *RECQL4* eta *NBN*), aztertutako SNP guztiak (n=42) ezberdinak ziren (2 Taula). Hamar genetatik hiru genetean (*TP53*, *GH1* eta *IGF1*), 4 SNPetan emaitza kontraesankorrak aurkitu daitezke ondorioetara heldu ezinik. Gainontzeko bi genetean, *MDM2* eta *CTLA4*, bi ikerketa lan baino gehiagotan 3 SNP OSren arriskuarekin asoziatu aurkitu genituen (3. Taula).

MDM2 genea faktore garrantzitsua da zelularen homeostasian eta hazkunde zelularrean, apoptosian eta seneszentzian p53, pRB eta E2F1 proteinak kontrolatzen ditu (30, 31). Gene honek nukleoko E3 ubiquitin ligasa kodetzen du eta p53 proteina tumore-ezabatzailearen degradazioa erregulatzen du (32). *MDM2* geneko polimorfismoek proteinaren funtzioa aldatu dezakete. Hori dela eta, ikerketa lan askok polimorfismo hauen asoziazioa aztertu dute OSren arriskuarekin. Gene honetan gehien aztertu diren polimorfismoak rs1690916 eta rs2279744 dira eta *MDM2*ren eskualde erregulatzailan kokaturik daude. Hortaz, proteinaren adierazpena aldatu dezakete (5. Irudia). Bi polimorfismo hauek gaixotasun honen arriskuarekin asoziatuta daudela behatu dute (33-36).



5. irudia. *MDM2* genean rs1690916 eta rs2279744 polimorfismoen kokapenaren adierazpena.

Bestalde, *CTLA4* genea immunoglobulinaren familiaren parte da eta T linfuzitoen seinale inhibitzailea transmititzen duen antigenoa kodetzen du. *CTLA4* proteinak T zelulen aktibazio atalazea igo dezake, erantzun antitumoral motelduz eta minbizia garatzeko suszeptibilitatea areagotuz (37, 38) (6. irudia).



6. irudia *CTLA4* generaren funtzioa. Zelula antigeno aurkezle (ZAA), T zelula eta OS zelula tumoralen arteko elkarrekintza hipotetikoaren adierazpena ((39)tik moldatua).

Orain arte, gene honetan 6 SNPen asoziazioa aztertu dira OSren arriskuarekin. Haien artean, rs231775 (+49G>A) aztertuen, *missense* aldaera honek aminoazidoen sekuentzia aldatzen du (treonina alaninagatik), eta horrek, *CTLA4* ekoizpena handitzen du (40). Horrez gain, SNP hau minbizi mota ezberdinei asoziatuta agertu da, esate baterako, bularreko minbizi, biriketako minbizi eta kolon eta ondesteko minbizi (41-43). Hori dela eta, polimorfismo honek ere OSren jatorrian parte har dezake.

2. taula. OS arriskua bi artikulu baino gehiagotan aztertutako 5 geneen zerrenda (jarraitzen du).

	Genea	Polimorfismoa	Kasuak	Kontrolak	Asoziaziorik	Bibliografia
Artikulu bakarrean aztertutako SNPen geneak	IGF2R	rs1003737	290	NA	BAI	(44)
		rs12202350	96	1426	BAI	(35)
		rs2282141	96	1426	BAI	
		rs2297372	96	1426	BAI	
		rs384167	96	1426	BAI	
		rs600324	96	1426	BAI	
		rs9456484	96	1426	BAI	
		rs1570070	104	74	EZ	(45)
		rs1803989	104	74	BAI	
		rs2065396	104	74	EZ	
		rs2282140	104	74	EZ	
		rs3777411	104	74	EZ	
		rs3798180	104	74	EZ	
		rs416572	104	74	EZ	
		rs435612	104	74	EZ	
		rs4709390	104	74	EZ	
		rs4709392	104	74	EZ	
		rs4709393	104	74	EZ	
		rs629849	104	74	EZ	
		rs648253	104	74	EZ	
	rs687088	104	74	EZ		
	rs7746102	104	74	EZ		
	rs894817	104	74	EZ		
	rs9456497	104	74	EZ		
	rs998074	104	74	BAI		
	rs998075	104	74	BAI		
	TGFBR1	rs1800469	202	216	EE	(46)
		rs1800470	202	216	BAI	
		rs334354	168	168	BAI	(47)
		rs10819639	96	1426	EZ	(35)
		rs11466445	168	168	BAI	(47)
	COL1A1	rs1061970	189	195	BAI	(48)
		rs2075559	189	195	BAI	
		rs17639446	96	1426	BAI	(35)
	RECQL4	rs1800012	72	143	EZ	(49)
		Polimorfismo ezezagunak	96	1426	EE	(35)
		rs4251689	98	69	EZ	(50)
		rs2721191	71	82	EZ	(51)
	NBN	rs372372052	71	82	EZ	
		rs1805794	120	120	BAI	(52)
		rs709816	120	120	EZ	
		rs1063054	120	120	EZ	
	rs13312970	96	1426	BAI	(35)	
	Polimorfismoak	98	69	EE	(50)	

Laburdurak: EE: ez eskuragarria. Berdean rs1690169 aztertutako artikuluak, gorri rs2279744 aztertutako artikuluak, rs231775 aztertutako artikuluak.

3. taula. OS arriskua bi artikulua baino gehiagotan aztertutako bost geneen zerrenda.

	Genea	Polimorfismoa	Kasua	Kontrolak	Asoziazioa	Bibliografia
Bi artikulua baino gehiagotan emaitza kontraesankorrak dituzten SNPen geneak	TP53	rs2909430	96	1426	NO	(35)
		rs1042522	201	250	BAI	(33)
		rs8079544	74	104	NO	
		rs1642785	74	104	NO	
		rs1042522	74	104	NO	
		rs9895829	74	104	NO	
		rs2909430	74	104	NO	(53)
		rs1800372	74	104	NO	
		rs1625895	74	104	NO	
		rs12947788	74	104	NO	
	rs1614984	74	104	NO		
	rs9894946	74	104	NO		
	rs56275308	17	37	ND	(34)	
	rs17878362	17	37	ND		
	GH1	rs7921	24	96	NO	(36)
		rs7921	96	1426	BAI	(35)
		rs11079515	96	1426	BAI	
		rs6771	104	74	NO	(45)
		rs6173	104	74	NO	
	IGF1	rs7956547	24	96	NO	(36)
rs10860864		96	1426	BAI		
rs10860869		96	1426	BAI		
rs17796225		96	1426	BAI		
rs2195240		96	1426	NO		
rs2288378		96	1426	BAI	(35)	
rs5742692		96	1426	BAI		
rs5742714		96	1426	BAI		
rs7956547		96	1426	BAI		
rs9651925		96	1426	BAI		
rs1019731	104	74	NO			
rs2162679	104	74	NO	(45)		
rs2288378	104	74	NO			
rs6220	104	74	NO			
Genes con SNPs BAInificativos en más de dos estudios	MDM2	rs2279744	96	1426	NO	
		rs1690916	96	1426	BAI	
		rs1196334	96	1426	BAI	(35)
		rs1695147	96	1426	BAI	
		rs1846402	96	1426	BAI	
		rs201821879	415	431	BAI	(54)
		rs199812774	415	431	BAI	
		rs1690169	24	96	BAI	(36)
	rs2279744	201	250	BAI	(33)	
	rs2279744	17	37	BAI*	(34)	
	CTLA4	c.75G>C	415	316	BAI	(55)
		c.326G>A	415	316	BAI	
rs231775		267	282	BAI		
rs4553808		267	282	NO	(56)	
rs5742909		267	282	NO		
CT60A/G	267	282	NO			
rs231775	205	216	BAI	(57)		

Laburdurak: EE; ez eskuragarria. Berdean rs1690169 aztertutako artikulua, gorritz rs2279744 aztertutako artikulua, rs231775 aztertutako artikulua.

Laburbilduz, gene kandidatuen estrategiaren aldetik, rs2279744 eta rs1690916 *MDM2* genean eta rs231775 *CTLA4* genean OSren arriskuarekin asoziatutako eta erreplikaturako

SNPak bakarrak dira. Beraz, hiru SNP hauek, orain arte ezagutzen diren OSren arriskuaren “markatzaile genetiko” bakarrak dira. Ondorioz, haien aefektua beste kohortetan aztertzea interegarria litzateke.

1.6.2 Genoma osoko asoziazio azterketak

Aldaera genetiko arrunten azterketarako bigarren estrategia genoma osoko aldaera genetikoaren bilaketa da. Azterketa mota hauei *Genome wide association study* (GWAS) edo GWA azterketa bezala ezagutzen dira. Orain arte, OSan GWA azterketa bakarra gauzatu zen 941 OS kasu eta 3.291 kontrol ikertuz. Egileek OSren arriskuarekin bi lokus berri topatu zituzten (Savage et al., 2013). GWA azterketa honen emaitzarik esangarriena *GRM4* genetik inguru kokatuta zegoen. Gene hau hartzaile glutamategikoen familiaren parte da eta osteoblasto (hezurra ekoizten dute) eta osteoklastoetan (hezurra bixurgatzen dute) adierazten direla behatu zen (59), hori dela eta, *GRM4* genea hezuraren osaketan parte hartu eta prozesu hau erregulatu dezakela uste dute (58). Bigarren emaitzik esangarriena generik gabeko zonalde intergenikoan zegoen. Hala ere, transkripzio faktore edo/eta *motif* erregulatzaileak lotzen ziren SNPekin lotuta zeuden ($r^2 > 0,6$). Horrez gain, GWA azterketako 30 emaitzik esangarrienen artean zortzi zonalde intergenikotan kokatuta zeuden (58).

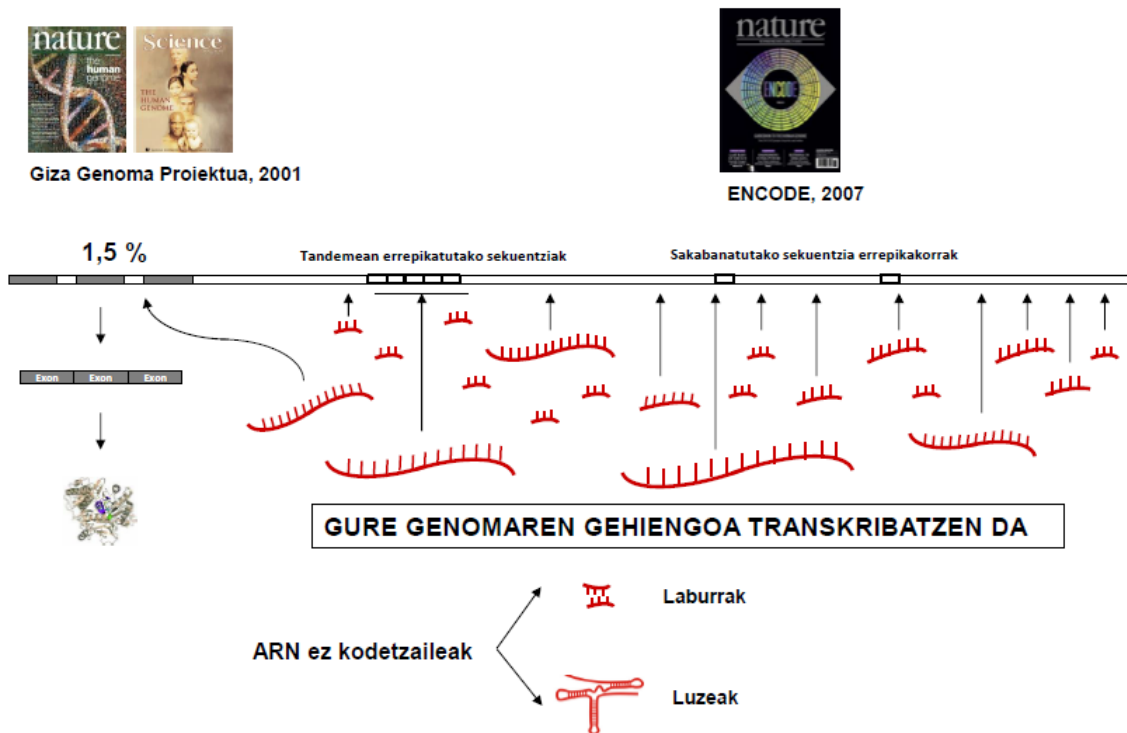
Laburbilduz, OSren gainean egindako ikerketa-lan gehienak gune kodetzailetan dauden aldaera genetikoak aztertu dituzte batik bat. Alabaina, GWA azterketak agerian jarri zuen bezala, azalpen biologikorik ez duten gune ez-kodetzailetan ere OSrekin asoziatutako aldaera genetikoak topatu ziren. Beste minbizien GWA azterketetan ere aurkikuntza bera gauzatu zen, hau da, gune ez-kodetzailetan 300 SNP inguru esangarri aurkitu ziren, haietatik %3,3ak proteinetan aldaketak sortzen zituzten, %40ek gune intronikoetan zeuden eta %44a gune intergenikoetan. Ezusteko emaitza hauek gune ez-kodetzailak minbiziaren garapenean gakoak izan daitezkeela iradokitzen dute (60).

GUNE EZ KODETZAILEAK

2.001. urtean Giza Genoma Proiektuak genomaren behin-behineko mapa plazaratu zuten. Proiektu honetan giza genomak 20.000-25.000 gene zeudela aditza eman zuten, soilik genomaren %1,5 izanik (61). Printzipioz, gainontzeko genoma zabor-DNA edo ez-funtzionala zela pentsatuz.

Ondoren, ENCODE (ENcyclopedia Of DNA Elements) proiektuan giza genomaren analisi sakonagoa egin zuten. Proiektu honen helburua elementu funtzional guztiak ezagutzea zen eta honi esker transkribatu primario eta helduen irudi zehatzagoa izatea ahalbidetu zuen (62). Proiektu honi esker, genomaren %80a baino gehiago proteinarik kodetzen ez duten elementuak dira. Aldi berean, elementu hauen %60 inguruk ARN ez kodetzaileak (ncRNA) dira.

Orokorrean, ncRNAk bi taldetan sailkatzen dira bere tamainaren arabera: ncRNA txikiak edo mikroRNAk (18-200 bp) eta ncRNA luzeak (>200 bp) (63). Minbiziaren alorrean gehien aztertutako ncRNAk mikroRNAk (miRNAk) dira (7. Irudia).

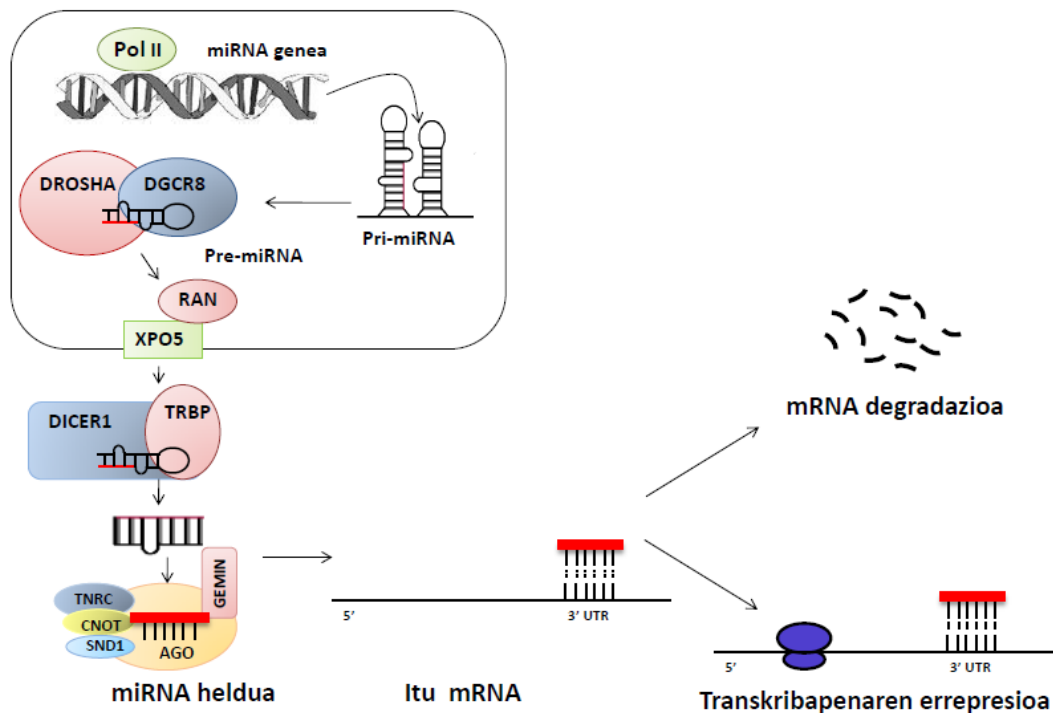


7. irudia. Genomaren transkribapena.

2.1. miRNAk

MiRNAk 18-20 nukleotidotako luzera duten ncRNA txikiak dira eta genomaren kokaleku ezberdinetatik transkribatu daitezke II RNA polimerasaren bidez transkribatu primario luzea edo pri-miRNA (300-5.000 bpko kate bikoitzeko RNA) sortuz. Pri-miRNAk, 30-40 nukleotidotako RNA harizpi bikoitzeko (*double-stranded RNA*, dsRNA) xingola itxura duen erdiguneko eskualde bereizgarria dute eta kate bakuneko (*single-stranded RNA*, ssRNA) bi eskualde erdigunetik kontrako muturretan. Pri-miRNAk nukleoan prozesatzen dira (DROSHA RNAsa eta DGCR8 proteinaren bitartez) dsRNArri lotzeko domeinua dute eta bere sekuentziak bere egitura zehazten du.

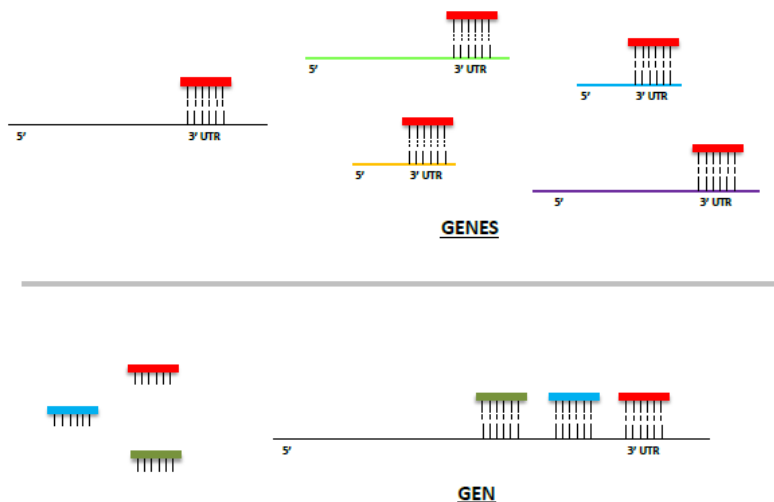
Pri-miRNAren prozesamenduaren ostean dsRNA eta muturreko xingola eskualdeak dituen molekula berria eratortzen da: pre-miRNA (70 nukleotido inguru). Molekula hauek nukleotik zitoplasmara Exportina5 (*Xpo-5*) (64, 65) eta RAN GTPasaren bitartez esportatzen dira. Zitoplasman, Dicer entzimak (66-68) eta TARBP2-rekin batera pre-miRNArri xingola moztu egiten diote dsRNA molekula, hau da, miRNA duplexa lortuz (69). MiRNA duplex hau banatzean kate bakuneko miRNA heldua lortzen da. MiRNA honen kateetako bat RISC (*RNA-inducing Silencing* konplexua) proteina konplexuan kargatzen edo eransten da. Konplexu hau osatzen *EIF2C1*, *EIF2C2*, *SND1*, *GEMIN3*, *GEMIN4* geneak eta CCR-NOT konplexua (70) daude. MiRNA heldua RISC konplexuak garraiatzen du RNA mezulariaren (mRNA) erregulazioa gauzatzen du sekuentzia osagarritasunagatik (71) (8. irudia).



8. irudia. miRNAen sintesiaren eskema orokorra (72)tik moldatua

MiRNAen bidezko erregulazioa, itu mezulariaren 3'UTR sekuentzien arteko osagarritasun bidez gertatzen da. Lotura hauek miRNAren egitura berezi baten bidez gertatzen dira, *seed* sekuentziaren bidez alegia. *Seed* sekuentzia honek 7 nukleotido ditu. MiRNAk lotura honen osagarritasunaren arabera dihardu. Lotura hauek guztiz osagarriak itzulpena ixilarazten da. Bestalde, osagarritasuna partziala denean mRNA degradatzen da (73). mRNA eta miRNA artean lotura gertatzeko miRNA bi elementuen arteko ezagutzarako sekuentzia espezifikoa dago: *seed* edo hazi-sekuentzia.

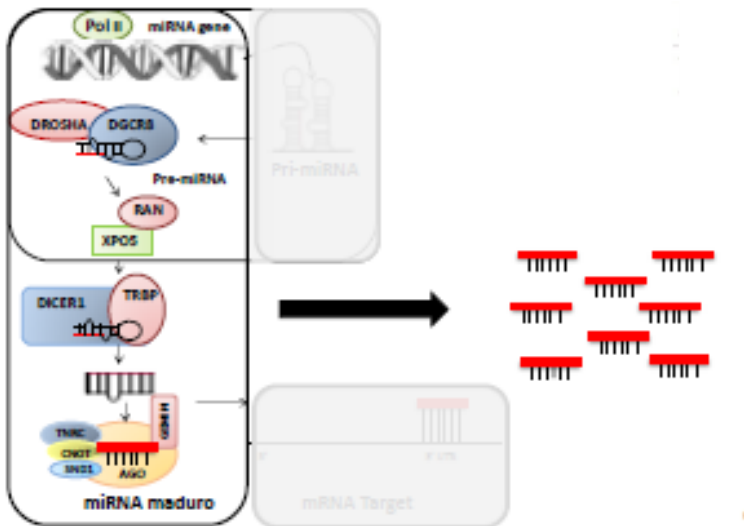
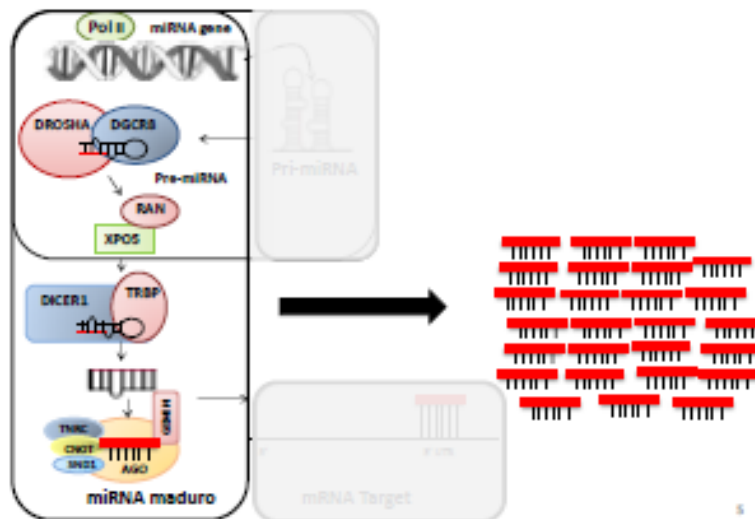
MiRNAk prozesu biologiko anitzetan inplikaturik dauden geneak erregulatzen dituzte hala nola, zelularen garapenean, desberdintzapen-prozesu eta proliferazioan, hemotopoesian, angiogenesisia eta apoptosian dihardutenak (74). MiRNAk *seed* sekuentzia hauekin osagarritzeko diren mRNA itu asko izan ditzateke sekuentzia honen tamainuagataik. Hori dela eta, miRNA batek gene anitz erregulatu ditzake dezakete eta aldi berean, gene batek miRNA anitzek (9. Irudia). Gaur egun, itu hauen iragarpenak *in silico* ematen dituzten datubase asko daude (miRNA eta TargetScan, kasu), baina gutxi balidaturik.



9. irudia. miRNA bidezko mRNA-loturaren adierazpena. A) miRNA batek zenbait itu-gene izan ditzake, B) miRNA desberdin askok gene berdina erregulatu ditzakete.

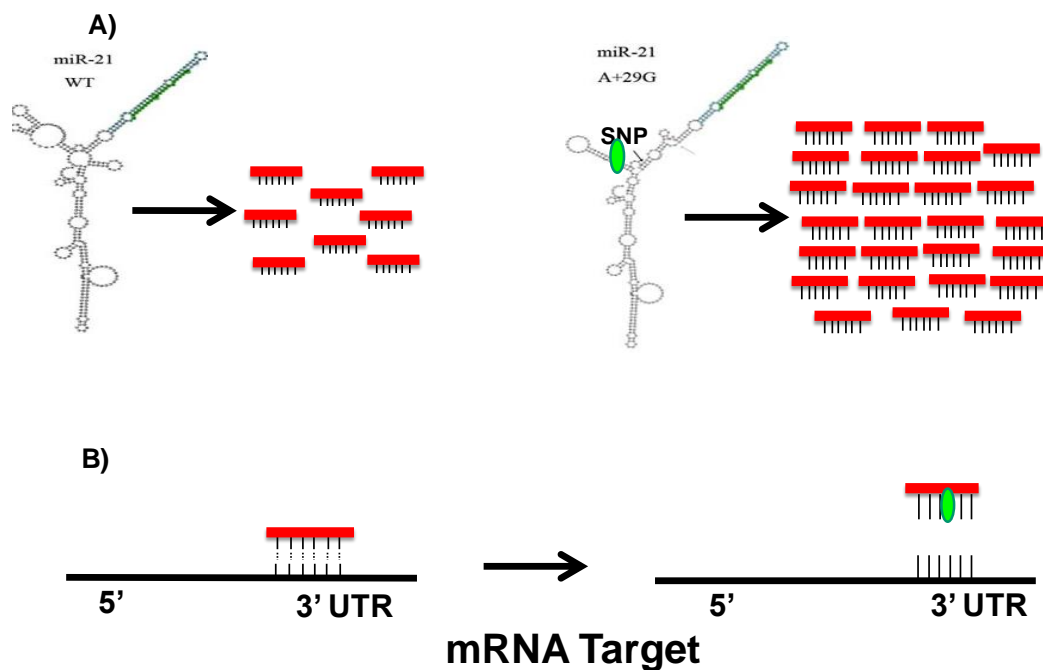
Horrez gain, miRNAk familietan taldekatzen dira *seed* sekuentzia honetan homologia aurkezteagatik edo genoman gertu egoteagatik (miRNA klusterra). Azken hauek, RNA kate luze batetik eratortzen dira (75). Bestalde, antzeko *seed* sekuentzia duten miRNAk, miRNA familia bateko kide guztiak alegia, potentzialki mRNA talde berdina erregulatzea espero da (76, 77).

miRNA bidezko erregulazioa alda daiteke bai miRNA mailetan zein itu mRNAen sekuentzietan alterazioak gertatzen direnean. Alde batetik, miRNA prozesamendu geneen alterazioak miRNA maila edo kontzentrazioak erregulatzen dituzte eta beraz, haien itu geneen erregulazioa alda ditzake. Polimorfismoak miRNA prozesamendu geneen funtzioa alda dezakete eta hortaz, miRNA mailak aldatu ditzakete (78) (10. Irudia).



10. irudia. miRNA prozesamendu genetako aldaera genetikoak (*DROSHA* genean adibidez) miRNA mailak alda ditzakete.

Horrez gain, miRNAen sekuentziak haien egitura eta itu genetikoko loturaren osagarritasuna definitzen dute. Hortaz, miRNA sekuentzian gerta daitezken aldaketak, SNPak kasu, haien egituraren, prozesamenduan eta hortaz, miRNA mailetan aldatzen dituzte. Bestalde, *seed* sekuentzian gertatzen diren aldaketak itu geneen loturan eragiten dute (11. Irudia a eta b)



11. irudia miRNA atako SNPak. A) miRNA egitura alda dezakete haien adierazpenean eraginez, edo B) miRNA-mRNA lotura sekuentzian eragin bere itu-genearen loturan eraginez.

2.2 miRNAen prozesamendu geneak eta minbizia

Duela gutxi, miRNA prozesamendu geneak zelulen transformazio eta tumorigenesian inplikatur daudela frogatu dute (80). Adibidez, bidezidor honetako geneen adierazpena aldatuta dago minbizian, esate baterako, *EIF2C2* genea (AGO konplexuan) eta *TARBP2* genea (DICER konplexuan) gain-adierazita daude prostata minbizian eta *DROSHA* eta *DICER* geneak ostera, azpi-adierazita bularreko minbizia (81). Gainera, zenbait ikerketa-lanek gene hauetan adierazpen aldaketak gertatzen direnean miRNA ekoizpenean eragiten dutela behatu dute (82-85), eta honek, minbizian eragiten duten geneen adierazpena alda dezakete. Ondorioz, miRNAen prozesamendu genetan dauden SNPak miRNAen funtzioa aldatu ditzakete. Izan ere, *DROSHA* genean rs640831 SNPak 56 miRNAen adierazpena aldarazten du biriketako minbizian (86).

Ildo honetan, arestian esan bezala, miRNAen prozesamendu geneen SNPak miRNAen funtzioan aldaketak eragin ditzakete. Izan ere, jadanik prozesamendu geneetako 7 polimorfismo minbizi mota ezberdinekin asoziatu dituzte (4. Taula).

4. taula miRNAen prozesamendu genetiko minbiziarekin asoziatu dituzten SNPak.

Genea	SNP	Gaixotasuna	Erreferentzia
TNRC6B	rs139919	Leukemia linfoblastiko akutua	(87)
XPO5	rs11077	Kartzinoma hepatozelularra	(88)
RAN	rs14035	Ahoko minbizia	(89)
AGO	rs636832	Birikietako minbizia	(90)
DGCR8	rs417309	Bularreko minbizia	(91)
	rs197412	Ahoko minbizia	(89)
GEMIN3	rs197414	Gernu-maskuriko minbizia	(93)
	rs197412	Giltzurrunetako minbizia	(94)
	rs2740348	Prostata minbizia	(95)
	rs7813		
GEMIN4	rs2740351	Obarioetako minbizia	(96)
	rs7813		
	rs2740351	Giltzurrunetako minbizia	(94)
	rs7813		

Nahiz eta jadanik polimorfismoak beste minbiziarekin asoziatu diren SNPen inplikazioa frogatu den oraindik gene hauen polimorfismoen papera ez da aztertu OSan. Hortaz, aldaera genetiko hauen papera OS jatorrian determinatzea interes handikoa litzateke.

2.3. miRNAk eta minbizia

Gaur egun, ncRNAen papera tumorigenesian guztiz frogatuta dago. Esan bezala, orain arte ncRNAen artean minbizian gehien aztertutakoak miRNAk dira. miRNAen adierazpena tumore-ehun eta ehun osasuntsuen artean ezberdina dela frogatu (97-99), orokorrean, azpiadierazita egonik tumore-ehunean (100). Azterketa hauek miRNAak bi taldetan sailkatzea ahalbidetu dute minbizian joka dezaketen funtzioaren arabera: onkomir (minbizian gain-

adierazita dauden miRNAk) eta miRNA tumore-ezabatzaileak (minbizian azpi-adierazita dauden miRNAk).

Espezifikoki OSan, miRNA adierazpen-sinadurak behatu dira OS patogenesisia eta progresioarekin asoziatu direnak (101-103). Hala ere, miRNAen papera osteosarkomagenesia oraindik ezezaguna da. Seirehun miRNA baino gehiagok osteogenesiaren erregulazioan parte hartzen dute, eta hori dela eta, edozein miRNA hauen adierazpen-aldaketak hezur-gaixotasunak eragin ditzaketela uste da (104). Estate baterako, mir-34c miRNAen gain-adierazpena osteoblastoen ezberdintzapena eta osteoklastogenesia areagotzen du Notch seinalizazio bidezidorraren ezabaketa dela eta. Notch bidezidorrak zelulen ezberdintzapen eta proliferazio orekaren mantenuaz arduratzen da (105). Beste adibide bat, 14q32 gene kromosomikoan dagoen miRNA kluster OS progresio eta pronostikoarekin asoziatu da (106).

Pre-miRNA/miRNAtan dauden SNPen (mir-SNPen) papera minbizi mota ezberdinetan andana aztertu da, mir-SNPen bilaketa bibliografiko eta asoziazio meta-analisiak gauzatu dira, esate baterako, mir-146a rs2910164, mir-196a2 rs11614913, mir-149 rs2292832 eta mir-499 rs3746444 minbizi mota askorekin asoziatuz (107, 108).

Orain arte, OSn mir-SNPen gainean, 2 azterketa egin dira 4SNP 4 miRNA (mir-34b/c, mir-34a, mir-146 eta mir-21) eta hauetatik, 2 SNP mir-34 familiako bi kidetan, mir-34b/c eta mir-34a miRNAtan hain zuzen ere, OSren arriskuarekin asoziatuak topatu zituzten (109, 110). Hala ere, nahiz eta mir-SNPen garrantzia frogatu den minbizian, OSn jatorriarekin ez dira asko aztertu.

HIPOTESIA ETA HELBURUAK

HIPOTESIA

OS lehen mailako hezur-minbizirik ohikoena da gazteen artean. Gaztaroan agertzeak bere jatorrian aldagai genetiko garrantzitsua duela iradokitzen du. Zenbait ikerketa lanek OSren suszeptibilitatearen atzean sartutasun txikiko aldaera genetikoak, hau da, gaixotasunean modu ahul eta gehigarrian eragiten duten aldaera genetikoak dira. Hala ere, oraindik ez da aldaera genetiko arrunta erantzulerik zehaztu.

Orain arte, ikerketa lan gehienak gune kodetzaileen aldaera genetikoak aztertu dituzte. Azterketa hauen artean, rs2279744 eta rs1690916 SNPak *MDM2* genean eta rs231775 *CTLA4* geneak bakarrik erakutsi dituzte emaitza sendoak OSren suszeptibilitatearekin.

Duela gutxi gune ez kodetzaileak minbizien jatorri eta bilakaeran inplikaturik daudela egiaztatu dute. Gune ez kodetzaileen artean miRNAk aztertuenak dira eta OSan erregulazio aldaketak behatu dira. Horrez gain, miRNAen adierazpenean aldaketak sortzen dituzten aldaera genetikoak minbizi askoren jatorri eta bilakaerarekin asoziatu dituzte.

Ondorioz, alde batetik, *MDM2* eta *CTLA4* genetako eta miRNAen funtzioan eragin dezaketen aldaera genetikoak OSren suszeptibilitatean eragin dezakete.

HELBURUAK

Tesi proiektu honen helburu nagusia OS pediatrikoaren suszeptibilitatearen markatzaile genetiko berrien bilaketa izan zen.

Horretarako, honako helburu espezifikoak ezarri genituen:

1. Literaturan OSren suszeptibilitatearekin asoziatutako markatzaileen balidazioa.

1. *MDM2* genean dauden rs1690916 eta rs2279744 polimorfismoen asoziazioa OSren suszeptibilitatearekin egaztatzea kasu-kontrol azterketa bi populazio berritan, bilaketa sistematikoa eta MAREN bidez.
2. *CTLA4* genean dagoen rs231775 polimorfismoaren asoziazioa OSren suszeptibilitatearekin egaztatzea kasu-kontrol azterketa, bilaketa sistematikoa eta MAREN bidez.

2. OSren suszeptibilitateari asoziatutako adierazpen aldaketa erakusten duten miRNAen identifikazioa.

1. Literaturaren azterketaren bidez adierazpen aldaketa duten miRNAen hautaketa.

3. OSren suszeptibilitatearekin asoziatutako miRNAekin erlazionatutako geneen aldaera genetikoak zehaztea.

1. MiRNA prozesamendu geneen aldakortasun genetikoa OSren suszeptibilitatearekin asoziatuta dagoen egiaztatzea eta haien efektu funtzionala aztertzea.
2. Pre-miRNAen aldakortasun genetikoa OSren suszeptibilitatearekin asoziatuta dagoen egiaztatzea eta haien efektu funtzionala aztertzea.

MATERIAL ETA METODOAK

1. PAZIENTEAK

Tesi proiektu honetan 1076 indibiduok parte hartu zuten: 176 gaixo eta 900 kontrol. Pazienteen laginak 4 ospitaletatik lortu ziren: Nafarroako Unibertsitatea Klinikatik, Madrilgo La Paz Ospitaletik, Donostia Unibertsitate Ospitaletik eta Esloveniako "University Children's Hospital"eko Onkologia Pediatrikotik. OS kasu guztiak patologo eta onkologo adituek diagnostikatu zituzten 1985tik 2013ra bitartean. Kontrolak emaile bolondresak ziren eta ez zuten erlaziorik gaixoekin.

Proiektu honetan partehartzaile guztiek borondatez onartu zuten parte hartzea behin azterketaren helburuaren berri emanda. Partehartzaile guztiek baimen informatua sinatu zuten. Adin-gabeko partehartzaile kasuan baimen informatua gurasoek sinatu zuten. Lagin guztiak kodifikatu ziren eta Helsinki-ko Hitzarmenaren xehetasunekin bat etorri ziren. Proiektu hau Etika Batzordeak onartu zuten (105/2009 eta 67/02/12). Partehartzaile guztien adina eta sexu datuak batu ziren. Tesi-proiektu honetan partehartzaileen datuak 5. taulan adierazi dira.

5 taula. Tesi-proiektuko populazioen adin, sexu eta jatorriaren datuak.

	Totalak		Kontrolak		Kasuak	
Partehartzaile kopurua	1076		900		176	
Adina (batazbestekoa, de)	46,63(18,48)		51,83(14,29)		18,94(12,59)	
Adin tartea	3-93		18-93		3-69	
Sexua	n	%	n	%	n	%
Gizonezkoak	540	50,18	447	49,66	93	52,84
Emakumezkoak	435	40,43	365	40,55	70	39,77
Ezezagunak	101	9,38	88	9,77	13	7,39
Indibiduo kopurua/ Zentrua	n	%	n	%	n	%
Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)	712	66,17	712	79,11		
Nafarroako Unibertsitatea Klinika	104	9,66			104	59,42
Madrilgo La Paz Ospitalea	9	0,84			9	45,71
Donostia Unibertsitate Ospitalea	4	0,37			4	22,85
Liublianako University Children´s Hospital	247	22,95	188	20,88	59	33,71
Indibiduo kopurua/Ikerketa						
<i>MDM2</i> genearen polimorfismoen asoziazio analisia	432		259		173	
<i>CTLA4</i> genearen polimorfismoaren asoziazio analisia	233		125		108	
miRNA prozesamendu geneen polimorfismoen asoziazio analisia	514		411		103	
miRNA geneen polimorfismoen asoziazio analisia	352		256		96	

de= desbiderapen estandarra

2. OSREN SUSZEPTIBILITATEARI ASOZIATURIKO SNPAK

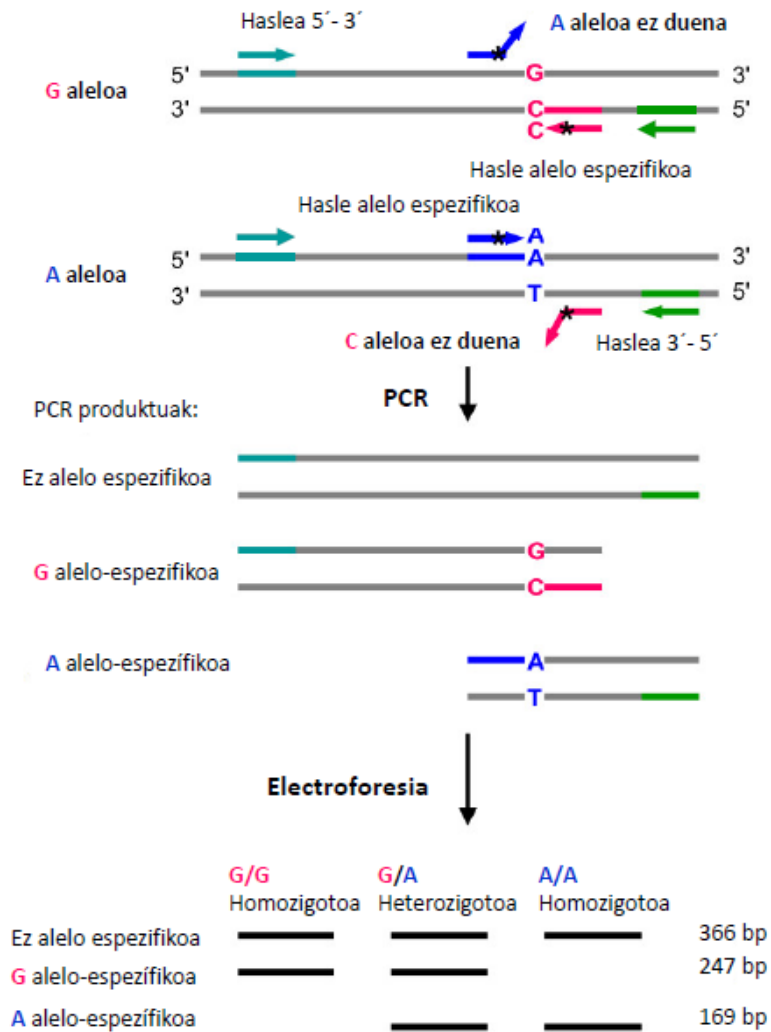
2.1 OSTEOSARKOMAREN SUSZEPTIBILITATEAREKIN ASOZIATUTAKO GENEEN

HAUTAKETA

Lehenik eta behin, OSren suszeptibilitatean eragiten duten aldaera genetikoekin erlazioa zuten lanak bilatu genituen Pubmed datubasean (polymorphisms OR “genetic variant” AND osteosarcoma OR “bone tumor”) terminoekin 2013. urteko azaroaren 21erarte. Bilaketa honen ostean, *MDM2* geneko rs1690916 eta rs2279744 SNPak eta *CTLA4* geneko rs231775 SNPak balidaziorako hautatu genituen, 3 SNP hauek literaturan asoziatuak topatu genituelako birritan gutxienez.

2.2 *MDM2* GENEAREN rs1690916 SNPAREN GENOTIPAZIOA *ARMS-PCR* BIDEZ

“Amplification Refractory Mutation System- Polymerase chain reaction” (*ARMS-PCR*) teknika base bateko edo delezio txikiko aldaera genetikoak bilatzeko erabili ohi da. Funtsean, SNP edo delezioaren aleloak detektatzeko hasle bikote bi diseinatzean datza. Hasle pare bakoitza alelo bakoitzak sortzen duen sekuentzian oinarrituz diseinatzen denez, alelo hori detektatzen du. Beraz, hasle pare bakoitza aleloarekiko espezifikoa da. Honako teknika honen azalpena 12. irudian adierazten da.



12. irudia. rs1690916 SNParen aleloen determinazioa ARMS-PCRa bidez.

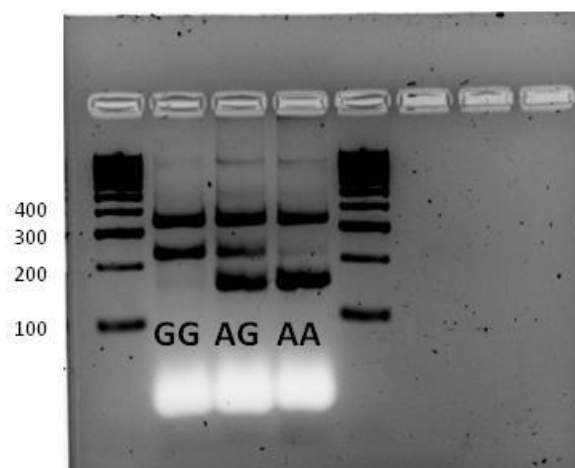
Hasle bikoteak rs1690916 SNPa dagoen kokalekuan gainezartzeko diseinatu dira hasle bikote bakoitzak espezifikoki bere aleloarekin elkartuz. Hasle bikote bakoitzak 5'-3' zentzuan duen hasle bat (*Forward* (F) eta 3'-5' zentzuan duen beste hasle bat (*Reverse* o R) du. Gainera, hasle bikote bakoitzaren PCR amplifikatuek tamaina ezberdintasun nabaria izateko diseinatu dira. Beraz, amplifikatutako produktua aleloarekiko espezifikoa ez den banda bat eta aleloarekiko espezifikoa den, eta beraz, aleloa determinatuko duen, beste banda batez osatuta dago. Hasleen sekuentzia 6. Taulan adierazten dira.

Taula 6. *MDM2* genean kokatuta dagoen rs1690916 SNPa genotipatzeko hasle sekuentziak.

<i>Izena</i>	<i>Sekuentzia (5'-3')</i>	<i>Hibridazio temperatura</i>	<i>Tamaina (bp)</i>
MDM2_rs16_F1	CCCCTAAGTTGAAAAACAACCTAAG	60°C	247
MDM2_rs16_R1	TGCTGACCCTGTCATTCTTG	60°C	
MDM2_rs16_F2	CCACCATTACCCGTAAGACA	60°C	169
MDM2_rs16_R2	GGCCAAGAAGGTAAGTTAAAGTGT	60°C	

G alelorako homozigotoek 2 banda sortzen zituzten: 247 bp eta 366 bp (13. irudian 2. Kalea); A alelorako homozigotoek bi banda sortzen zituzten: 169 eta 366 bp (13. irudian 2. kalea) eta heterozigotoek 3 banda sortzen zituzten: 169, 247 y 366 bp (13. irudian 3. kalea). Banden adierazpena 13. irudian adierazten dira.

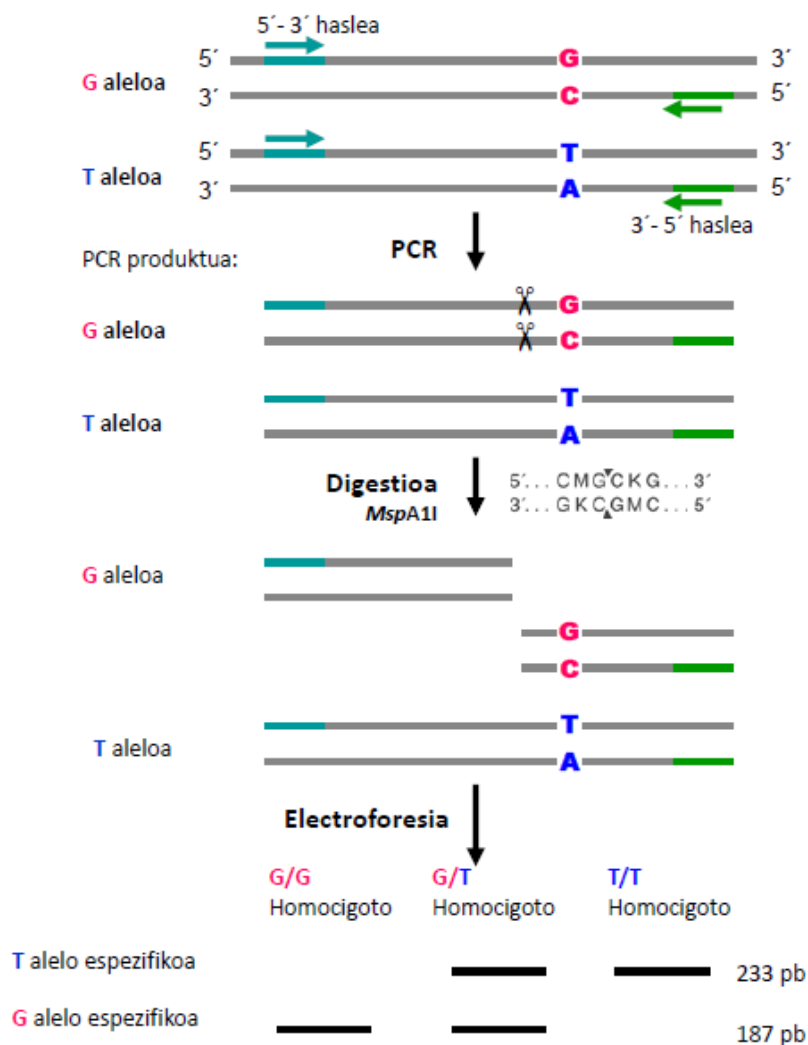
Agarosazko gelen (%2) elektroforesia TBE 1X tanpoiarekin egin genituen, SYBR Safe-ekin tindatuz eta 90V boltai konstantearekin 30 minutuz migratuz. Lagin bakoitzarekiko 6 µl amplifikatu eta 4 µl karga soluzioarekin nahastu genuen Hyperladder IV (100–1000 pb) martkatzaile molekularra erreferentziazat hartuz. Gelen behaketa ultramore izpien bidez egin genituen BioRad etxeko ChemiDoc XRS dokumentazio gailuarekin.



13. irudia. rs1690916 genotipazioaren emaitzak agarosazko gelan.

2.3 MDM2 GENEAN rs2279744 SNPAREN GENOTIPAZIOA PCR-RFLP BIDEZ

“Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism” (*PCR-RFLP*) teknikak PCR bidezko DNA amplifikazioa eta errestrikzio entzimen erabilpena konbinatzen du. PCR-ak SNPa dagoen DNA fragmentua amplifikatzen du eta errestrikzio entzimek SNPa dagoen kokapena moztu ahal izango du aleloaren arabera. Horrela, luzera ezberdineko fragmentuak ikusten dira, eta luzera ezberdinak genotipoa determinatzea ahalbidetzen du. Honako teknika honen azalpena 14. irudian adierazten da.



14. irudia. PCR-RFLP-a rs2279744 SNP-aren aleloen determinaziorako. T aleloa determinatzen duen bandak 233 bpko luzera du eta G aleloak 187 bp-koa. Irudian ez dira 100 bptako baino banda txikiagoak adierazi.

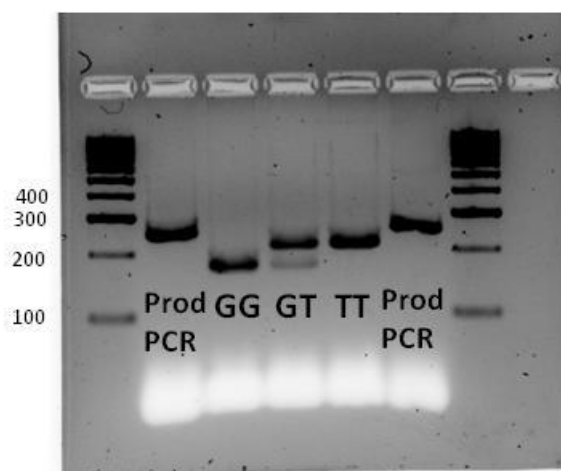
PCR amplifikazio egokia konprobatu genuen agarosazko %2ko gelan. Ondoren, PCR amplifikatua *MspA11* errestrikzio entzimarekin gau oso batez 37°C-tan moztu genuen (7. Taula). Errestrikzio entzima honek 5'-C(A/C)G'C(G/T)G-3' sekuentzia ezagutzen du espezifiki eta

bertan rs2279744 bostgarren posizioan dago. G alelorako homozigotoak zirenak 3 fragmentu sortzen zituzten: 31 bp, 46 bp eta 187 bp; heterozigotoak 4 fragmentu sortzen zituzten: 31 bp, 46 bp, 187 bp eta 233 bp eta T alelorako homozigotoak 2 fragmentu sortzen zituzten: 31 bp eta 233 bp.

7. taula. *MDM2* genean kokatuta dagoen rs2279744 SNPa genotipatzeko PCR hasle sekuentziak.

<i>Izena</i>	<i>Sekuentzia (5'-3')</i>	<i>Hibridazio tenperatura</i>	<i>Tamaina (bp)</i>
MDM2_rs22_F	CGGGAGTTCAGGGTAAAGG	60°C	233
MDM2_rs22_R	CTGGGAAAATGCATGGTTTAA	60°C	

Errestrikzio entzima NEBcutter v2.0 softwarea (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>)(New England Biolabs) erabiliz aukeratu zen. Bai PCRaren produktua eta digestio osteko produktuen elektroforesia %2ko agarosazko gelen bitartez egin zen. 15. Irudian agarosazko gelaren genotipoak adierazi dira.



15. irudia. rs2279744 genotipazioaren emaitzak agarosazko gelan.

2.4. MDM2 GENEAREN rs1690916 ETA rs2279744 SNPEN META-ANALISIA

Bilaketa estrategia

MDM2 genearen bi polimorfismoen, rs1690916 eta rs2279744, eta osteosarkomaren asoziazioa aztertzen zituzten artikuluak topatzeko bilaketa sistematikoa egin genuen. Horretarako, Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) eta Scopus (www.scopus.com) datubase bibliografikoak erabili genituen honako termino hauek erabiliz:

1. ("bone tumor" or osteosarcoma) and (polymorphism or SNP)
2. rs1690916 or rs2279744 or T309G
3. (MDM2 or "murine double minute 2") and ("bone tumor" or osteosarcoma)

Gure bilaketak 2014ko otsailaren 24arte argitaratuta zeuden erregistro guztiak kontuan hartu zituen.

Inklusio eta eskusio irizpideak

Bi datubasetan aurkitu genituen argitaratutako erregistro guztietatik jarraian deskribatzen diren inklusio irizpideak betetzen zituztenak eduki genituen kontuan:

- a) Asoziazio azterketa independenteak
- b) rs1690916 eta/edo rs2279744 polimorfismoak osteosarkomaren suszeptibilitatearekin aztertutako lanak
- c) Datu genotipiko edo alelikoak adierazten zituzten artikuluak

Jarraian, bilaketen artean errepikatuta zeuden artikuluak kendu genituen. Gero, lehenengo hautaketa fasea egin genuen. Fase hau ez gainditzeko arrazoiak edo eskusio irizpideak hauek dira:

- a) Beste argitalpen mota bat izatea: berrikuspenak, editoreari igorritako gutunak, meta-analisiak etab.
- b) Beste gaixotasun bat aztergai izatea.
- c) Gizakia ez den beste organismo edo lerro zelularretan egindako lanak.
- d) Ingeleseaz argitaratu ez izatea.

e) Beste kokapen genomiko bat aztertzea: Beste gene, genoma mota (mitokondrial DNA) edo beste gune kromosomiko aztertzen dutenak.

f) Genotipatzeko ez den beste teknika bat erabiltzea: gene adierazpen teknikak, metilazio teknikak, karakterizazio biokimikoa edo morfologikorako teknikak, entsegu funtzionalak egiteko teknikak, klonazio esperimentuak, elkarrekintza genikorako teknikak etab.

g) Beste aldaera genetiko mota aztertzea: Beste polimorfismo batzuk aztertu, beste mutazioak, CNV, LOH, mikrosateliteak edo DNAn alterazioak aztertu dituzten artikulak.

h) Ez dute suszeptibilitatea aztertzen: Azterketa farmakogenetikoak, farmakoei erantzuna, pronostiko, biziraupena eta toxizitate azterketak kategoria honetan kokatu genituen.

i) 1990. urtea baino lehenagoko azterketak.

Hautaketa prozesu honen lehenengo fasea artikuluen laburpenean oinarritu zen. Laburpenik ez zuten artikulak zuzenean bigarren fasera pasatu genituen. Bigarren fasean artikulua osoaren edukian oinarritu ziren. Kasu honetan, eskusio irizpide berdinak erabili ziren, bi gehituz: (1) 10 lagin baino gutxiago erabiltzen zituzten azterketak eta (2) Testu osoa ez zuten artikulak. Horrela, gure meta-analisan parte hartu zuten artikulua kopurua ezagutzen. Horrez gain, artikulua hauen erreferentziak aztertu genituen, gure erabilitako datubasetan indexatuta ez zeuden eta gure inklusio irizpideak bete zitzaizkeen artikulak bilatzeko.

Bilaketa bibliografikoa eta artikulua hautaketa bi ikertzailek egin zuten modu independentean eta ezadostasunak bi ikertzaileek bat etorri arte argitu ziren. Prozesu guztia bilaketa sistematikoan grafikoki adierazi zen fluxu-diagrama edo *flow-chart*, ingelesez bidez (emaitza atalean). Adierazpen honetan meta-analisan parte hartzen duten artikulak zehazten da eta irizpide bakoitzagatik baztertutako artikulua kopurua adierazten da.

Datu erauzketa

Artikulu bakoitzetik argitalpen urtea, egileen izenak, etnia, paziente eta kontrol kopurua eta rs1690916 eta/edo rs2279744 polimorfismoen frekuentzia genotipikoak bildu genituen. Artikuluan frekuentzia genotipikoen berri ematen ez zenean egileei informazioa eskatu genien.

Bai rs1690916 bai rs2279744 *MDM2* genean OSaren arriskuan eragiten zuten jakiteko bilaketa bibliografikoa eta meta-analisia egin genuen. Gure meta-analisan hautatutako

artikuluen datuak eta tesi honen aurreko atalean lortutako bi polimorfismoen datuak hartu genituen kontuan. MArako erabili genituen artikuluen guztien kalitatea aztertu genuen datuen berranalisiarekin.

Artikuluen kalitate analisia

Artikuluen kalitatea bi ikertzailek aztertu zuten modu independentean. Artikulu bakoitza “metodologiaren kalitatea aztertzeko eskala” (8. taula), aurretik argitaratutako meta-analisiaren erabilitako moldatu genuen (132, 133). Eskala honetan bost atal zeuden: kasuen adierazgarritasuna, kontrol laginaren jatorria, genotipazio teknikaren kontrol kalitatea eta Hardy-Weinberg oreka (HWO), kontu handiz aztertu genituen. Kalifikazioa 0 eta 10 artean zeuden eta 5 puntu baino gehiago lortzen ziren kasuetan kalifikazio onargarritzat hartzen zen.

8. taula: Artikuluen metodologiaren kalitatea aztertzeko eskala.

Irizpidea	Puntuazioa
1. Kasuen adierazgarritasuna	
OS diganotikatzeko irizpide ezaguna	2
OS diagnostikatzeko irizpidea aipatu da baina ez da zehazki deskribatu	1
Ez da deskribatu	0
2. Kontrol laginaren jatorria	
Populazio orokorra	3
OS gabe eta ospitaletik jasotakoa	2
Zehaztugabeko bolondres osasuntsuak	1
OS-rekin erlazionatutako gaixotasunak eta OS ez dituzten kontrolak	0,5
Zehatugabea	0
3. Lagin tamaina	
>100	2
25-100	1
<25	0
4. Genotipazio teknikaren kontrol kalitatea	
Metodo ezberinarekin lagin guztiak/parte bat berranalizatu ziren	2
Metodo berdinarekin lagin guztiak/parte bat berranalizatu ziren	1
Ez da deskribatzen	0
5. Hardy-Weinberg oreka (HWO)	
Kontrol populazioa Hardy-Weinberg orekan	1
Kontrol populazioa Hardy-Weinberg desorekan	0

Meta-analisia

rs1690916 eta rs2279744 polimorfismoak eta OS-aren arriskuan duen eragina herentzia genetiko eredu alelikoa, kodominantea, dominantea eta errezesiboaren bitartez aztertu genuen. Artikulu guztien genotipoen datuak konbinatu genituen Mantel-Haenszel estatistikoaren zorizko efektuen ereduaren bitartez OR estimatzaile globala eta %95 konfidantza tartea (%95ko KT) kalkulatu suszeptibilitatearen asoziazio analisia egiteko (134).

Zorizko efektuen ereduaren ustez, meta-analisia egiteko erabiltzen diren artikuluen arteko aldakortasuna zoriari eta artikuluko bakoitzaren ekarpenari atxikitzen zaio. Datu hauek R softwarearen meta liburutegia erabiliz kalkulatu genituen (R softwarea 3.0.3 bertsioa, the R Foundation for Statistical Computing). Meta-analisiaren emaitzak forest plot deitzen den irudiaren bitartez adierazi ziren. Adierazpen honetan artikuluko bakoitzaren OR bere %95 KTrekin, lagin tamaina eta meta-analisiaren estimazio globala adierazten da.

Heterogeneotasun analisia

Meta-analisiaren heterogeneotasuna I^2 estatistikoaren bitartez kalkulatu zen. Heterogeneotasuna ez da meta-analisia egiteko erabiltzen diren artikuluko kopuruen menpekora baizik eta artikuluen arteko aldakortasunarena. Estatistiko hau 0 eta %100 bitartekoa da eta artikuluko bakoitzak duen heterogeneotasuna adierazten du. I^2 %0-25 balioak heterogeneotasunik ez dagoela adierazten du, %25-50 neurrizko heterogeneotasuna adierazten du, %50-75 heterogeneotasun altua eta %75-100 heterogeneotasun oso altua. Heterogeneotasun altua dagoen kasuetan influentzia analisia egiten da jakiteko ze artikuluko den heterogeneotasunaren iturria. Analisi hau meta-analisan parte hartu duten artikuluko bana kenduz meta-analisiaren berrestimazioak egitean datza. Beraz, heterogeneotasunaren iturria zein artikuluko den ikusi ahal dugu.

Publikazioaren alborapenaren analisia

Argitaltzeari begira, emaitza positiboak edo adierazgarriak dituzten artikuluko argitaltzea probableagoa da ondorio gabeko emaitzak edota emaitza negatiboak dituzten artikuluko baino beraz, bilaketa sistematikoan emaitza alboratuak eragin ditzake (135, 136). Fenomeno honi publikazio alborapena deitzen zaio. Bilaketa sistematikoan argitaratugabeko artikuluko baztertzen dira beraz, emaitza positiboak (gure kasuan, asoziazio positiboak) esposizio (gure kasuan, SNP arrisku aleloa izatea) eta gertaera (gure kasuan, osteosarkoma izatea) benetako erlazioan gainestimazioak dakartza (137).

Literaturaren publikazioaren alborapenaren analisia Egger-ren test-aren bitartez analizatu zen (138) eta Begg-en *funnel plot* irudiaren bitartez adierazten da. Irudi honetan, alborapenik gabeko egoera (hipotesi nulua) gure emaitzekin kontrastatzen da.

2.5 CTLA4 GENEAREN rs231775 SNPAREN GENOTIPAZIOA

CTLA4 genean kokatuta dagoen rs231775 SNPa OSren suszeptibilitatearen "markatzaile" potentzialetako bat dela ikusi genuen. Hori dela eta, SNP honen asoziazioa balidatzea erabaki genuen. Horretarako, PCR-RFLP genotipazio teknika erabili genuen, *BstEII* errestrizio entzimaren bitartez. Hasleen sekuentzia 9. Taulan adierazi dira.

9. taula. *CTLA4* genean kokatuta dagoen rs231775 SNPa genotipatzeko hasleen sekuentzia.

<i>Izena</i>	<i>Sekuentzia (5'-3')</i>	<i>Hibridazio temperatura</i>	<i>Tamaina (bp)</i>
CTLA4_rs23_F	AAGGCTCAGCTGAACCTGGC	64.2°C	153
CTLA4_rs23_R	CTGCTGAAACAAATGAAACCC	59.6°C	

2.6. CTLA4 GENEAREN rs231775 SNPAREN META-ANALISIA

CTLA4 genearen rs231775 SNP eta OSren asoziazioa aztertzen zituzten artikuluak topatzeko bilaketa sistematikoa eta meta-analisia egin genuen *MDM2* genearen SNPen azterketako metodoa jarraituz (2.4 atalean).

Kasu honetan, bilaketa estrategia hurrengo hauek izan ziren:

1. ("bone tumor" or osteosarcoma) and (polymorphism or SNP)
2. rs231775 OR +49G>A
3. (*CTLA4* or "cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4") and ("bone tumor" or osteosarcoma)

Gure bilaketa 2014ko martxoaren 25arte argitaratuta zeuden erregistro guztiak kontuan hartu zituen.

Ondoren, gure azterketako datuak eta bilaketa sistematikoan topatutako artikuluak meta-analisan erabili genituen. rs231775 SNPren asoziazioa OSrekin AA vs GG+GA eta modelo alelikoarekin (A vs G) egin genuen.

3. MIRNA GENEKIN ERLAZIONATUTAKO SNPAK

Gure helburua OSren suszeptibilitatearekin erlazionatutako adierazpen aldaketa azaltzen dituzten miRNAk topatzea zen.

3.1 OSREN SUSZEPTIBILITATEAN ADIERAZPEN ALDAKETA AGERTZEN DUTEN MIRNA BILAKETA

Bilaketa estrategia

miRNA adierazpen aldaketak eta osteosarkomaren suszeptibilitatearekin aztertzen zituzten artikuluak topatzeko bilaketa sistematikoa egin genuen. Horretarako, Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) datubase bibliografikoa erabili genuen honako (“mir” OR “miRNA”) AND osteosarcoma terminoak erabiliz. Gure bilaketa 2014ko uztailaren 22arte argitaratuta zeuden erregistro guztiak kontuan hartu genituen.

Inklusio eta esklusio irizpideak

Bilaketa honen helburua miRNA adierazpen ezberdintasunak aztertzen zituzten artikuluak topatzea zen. Zehazki, adierazpen ezberdintasunak OS pediatrikoa gaixoen hezur osasuntsua indibiduo osasuntsuen hezur osasuntsuarekin konparatzen zituzten artikuluak topatzea zuen helburu.

Lehenengo fasean artikuluen laburpenaren irakurketan oinarritu zen. Fase hau ez gainditzeko arrazoiak edo esklusio irizpideak hauek dira:

- a) Datubasearen artikulua.
- b) Beste gaixotasun bat aztergai izatea.
- c) Gizakia ez den beste organismo edo lerro zelularretan egindako lanak.
- d) miRNAen itu geneen bilaketa ikertzen zituzten artikuluak.
- e) Beste argitalpen mota bat izatea: berrikuspenak, editoreari igorritako gutunak, meta-analisiak etab.

f) Beste kokapen genomiko bat aztertzea: Beste gene edo beste ncRNA geneak aztertzen dutenak.

g) miRNAen jokamoldea farmakoen aurrean aztertzen zutenak.

h) Ez dute suszeptibilitatea aztertzen: Azterketa farmakogenetikoak, farmakoei erantzuna, pronostiko, biziraupena eta toxizitate azterketak kategoria honetan kokatu genituen.

Laburpenik ez zuten artikuluak zuzenean bigarren fasera pasatu genituen. Bigarren fasean artikulu osoaren edukian oinarritu ziren. Kasu honetan, eskusio irizpide berdina erabili ziren, bi gehituz: (1) OS pediatrikoa (<34 urte) aztertzen zituztenak eta (2) Testu osoa ez zuten artikuluak. Horrez gain, artikulu hauen erreferentziak aztertu genituen, guk erabilitako datubasetan indexatuta ez zeuden eta gure inklusio irizpideak bete zitzaizkeen artikuluak bilatzeko.

Bilaketa bibliografikoa eta artikulu hautaketa bi ikertzailek egin zuten modu independentean eta ezadostasunak bi ikertzaileek bat etorri arte argitu ziren. Prozesu guztia bilaketa sistematikoan grafikoki adierazi zen fluxu-diagrama edo *flow-chart*, ingelesez bidez (emaitza atalean).

Datu erauzketa

Artikulu bakoitzetik argitalpen urtea, egileen izenak, etnia, paziente eta kontrol kopurua, miRNA adierazpen tendentzia eta adieragazgarritasun balioa bildu genituen aztertu ziren miRNA guztietan.

3.2 MIRNA PROZESAMENDU GENEEN SNPEN AZTERKETA

3.2.1 MIRNAEN PROZESAMENDU-GENEEN ETA SNPEN HAUTAKETA

MiRNAren prozesamenduan parte hartzen duten gene guztiak, 21 gene guztira, aukeratu ziren. Bibliografiaren azterketa sakona egin zen (“microRNA-machinery genes” OR “microRNA Biosynthesis Pathways”) terminoekin, zenbait errebisio artikuluetatik bildu genituen (72, 139) (10. taula).

10 taula. miRNA prozesamenduan parte hartzen dituzten geneak.

MIRNA PROZESAMENDU-GENEAK		
RISC KONPLEXUA	GENIM KONPLEXUA	<i>GENIM3</i>
		<i>GENIM4</i>
		<i>GENIM5</i>
	AGO	<i>EIF2C1</i>
		<i>EIF2C2</i>
		<i>HIWI</i>
	CCR-NOT KONPLEXUA	<i>CNOT1</i>
		<i>CNOT2</i>
		<i>CNOT3</i>
		<i>CNOT4</i>
		<i>CNOT5</i>
		<i>CNOT6</i>
	GW182	<i>TNRC6A</i>
		<i>TNRC6B</i>
SND1	<i>SND1</i>	
DROSHA/DGR8	DGCR8	<i>DGCR8</i>
	DROSHA	<i>DROSHA</i>
DICER KONPLEXUA	XPO5	<i>XPO5</i>
	RAN	<i>RAN</i>
	DICER	<i>DICER</i>
	TRBP	<i>TRBP</i>

Hogeitabat gene hauetan 72 SNP hautatu ziren hurrengo irizpide hauek jarraituz (a) $r^2 > 0.8$ duten tagSNPak, hautatutako gene guztien aldakortasun genetikoa kontuan izateko. TagSNPen aukeraketarako nazioarteko HapMap proiektuaren datubasea (24. bertsioa; <http://www.hapmap.org>) eta Haploview softwarea (4.2 bertsioa; <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) (Broad Institute, Cambridge, USA) erabili ziren; (b) Efektu funtzional potentziala zuten SNPak aukeratu genituen: aa aldaketa, moztitsasketa

alternatiboa, geneen promotorean dauden transkripzio-faktoreen lotura unean kokatuta zeuden SNPak eta miRNAen itua sortu/ezabatzen dituzten SNPak. SNPen efektu funtzionala, F-SNP (<http://compbio.cs.queensu.ca/F-SNP/>) (Queen's University, Kingston, Canada), FastSNP (<http://fastsnp.ibms.sinica.edu.tw>) (Academia Sinica, Taipei, Taiwan) eta Patrocles (<http://www.patrocles.org/>) (University of Liège, Belgium). (c) Gainera, bibliografian minbiziarekin asoziatutako SNPak ere hautatu genituen.

Aukeratutako SNPen alelo minimoaren maiztasuna (AMM) populazio europearra eta kaukasikoan %5a baino handiagoa ($AMM \geq 0,05$) zuten (11. Taula eta 10 taula osagarria).

11. taula. MiRNA prozesamendu-geneen SNP hautaketa.

Genea	SNPak
<i>CNOT1</i>	rs11644694, rs11866002, rs37060
<i>CNOT2</i>	rs10506586
<i>CNOT3</i>	rs42318
<i>CNOT4</i>	rs1003226, rs3763425, rs3812265
<i>CNOT6</i>	rs11738060, rs6877400
<i>DGCR8</i>	rs1640299, rs35987994, rs3757, rs417309, rs9606248
<i>DICER1</i>	rs1057035, rs1209904, rs13078, rs3742330 ¹
<i>DROSHA</i>	rs10035440, rs10719, rs17408716, rs2287584, rs3792830, rs3805500, rs4867329, rs493760, rs55656741, rs639174, rs6877842, rs6884823, rs7735863
<i>EIF2C1</i>	rs595961, rs636832
<i>EIF2C2</i>	rs2292778, rs2293939, rs4961280
<i>GEMIN3</i>	rs197388, rs197412, rs197414, rs563002
<i>GEMIN4</i>	rs1062923, rs2740348, rs34610323, rs3744741, rs7813, rs910924
<i>GEMIN5</i>	rs1974777, rs6865950, rs816736
<i>PIWIL1</i>	rs1106042
<i>RAN</i>	rs11061209, rs14035
<i>SMAD5</i>	rs3764941, rs3764942
<i>SND1</i>	rs17151639, rs17676986, rs322825, rs3823994
<i>TNRC6A</i>	rs6497759
<i>TNRC6B</i>	rs139919, rs2413621, rs470113, rs4821943, rs9611280
<i>TARBP2P</i>	rs784567
<i>XPO5</i>	rs1106841, rs2227301, rs2257082, rs34324334, rs7755135

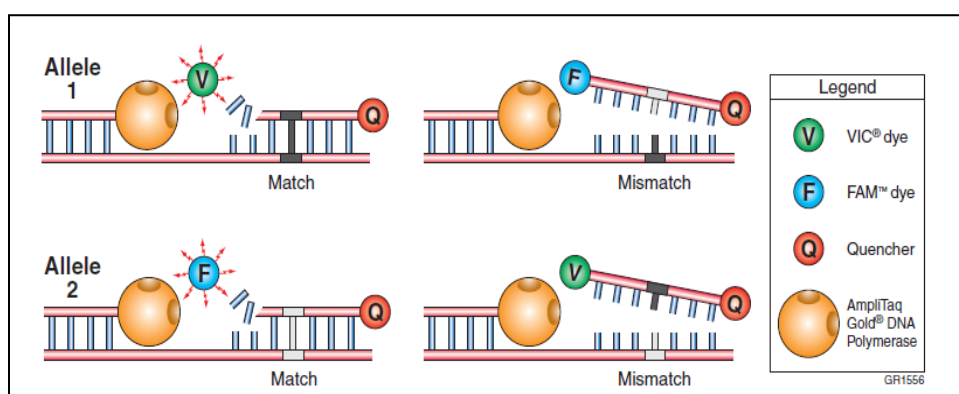
3.2.2 MIRNA PROZESAMENDU GENEEN SNPEN GENOTIPAZIOA

miRNA prozesamendu-geneen genotipazioa Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Zerbitzu Orokorretan (SGIKER) egin genuen Taqman Open Array teknologiaren bitartez Applied Biosystems (Foster City, CA) etxeak ematen dituen argibideak jarraituz.

Taqman Open Array genotipazio plataformak 3072 nanoporodun *array*-etan SNP-en genotipaziorako Taqman entseguak zituen. Nanoporo bakoitzean SNP bakoitzaren zundak (erreakzioa bakoitza independentea da) kokatzen dira eta horregatik, teknologia honek bai SNP eta lagin kopurua aldetik diseinu aukera anitza aurkezten dizkigu.

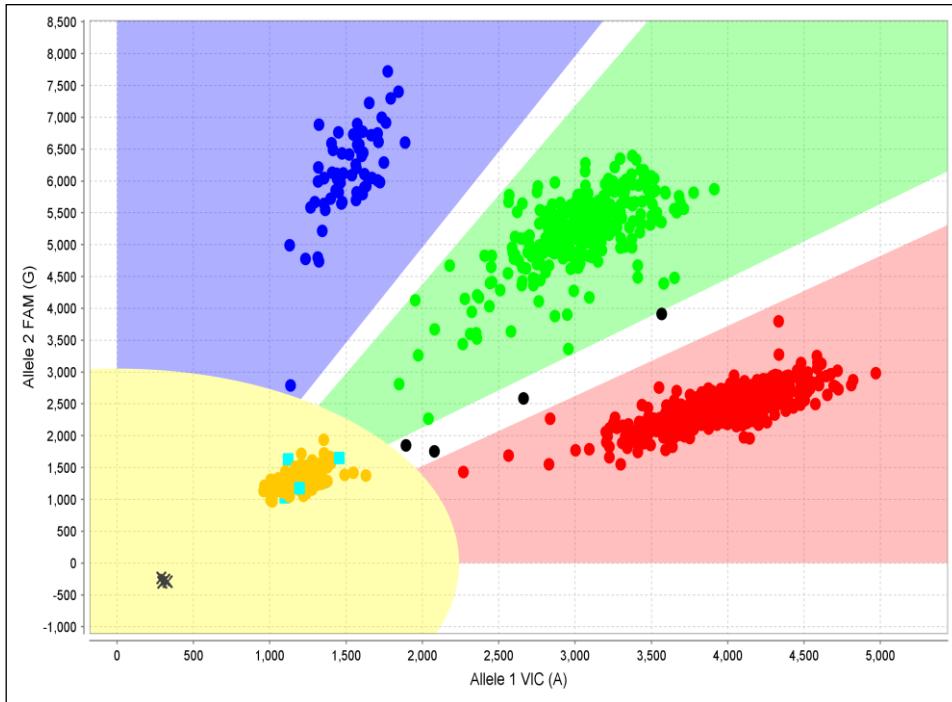
Taqman zundak diseinua PCR produktuen ekoizpena neurtzeko gaitasuna duite fluorokromo bi bidez markatuta dauden zunda sistema erabiliz: fluoroforotako bat 5' muturrean (ingelesez, *reporter*) eta 3' muturrean fluoreszentsia igorpena blokeatzen duen beste molekula (ingelesez, *quencher*). Markatutako zunda hau espezifikoki hibridatzen da PCR produktuaren erdiko partean. Beraz, PCR-a egiten denean (hasle bikotea eta zundarekin batera), zunda aplikoiarekin hibridatzen da, baina fluorofoa eta *quencher* molekula hurbil egoteagatik ez da fluoreszentsiarik igortzen. Beraz, fluoreszentsia aplikoi kantitatearekin erlazionatuta dago (16. irudia).

Floureszentsia "Real Time ABI PRISM 7900 sequence detector" tresnarekin detektatu genuen. Beraz, SNP bakoitzarentzat genotipo bakoitzak floureszentsia espezifikoa du: berdea, 1 aleloarentzat homozigotoa (5' muturrean VIC flouroforoa), urdina, 2 aleloarentzat homozigotoa (5' muturrean FAM fluoroforoa) eta horia, heterozigotoen kasuan (16. irudia).



16 irudia. Taqman zunda bidezko polimorfismoen genotipazioaren adierazpena (140).

Genotipazioaren emaitzak "Taqman Genotyper" softwarearen bitartez *cluster* eta *calling* analisiak egin genituen (17. irudia). *Clustering*-a fluoreszentsia seinalean oinarrituz laginen taldekatzea da. *Calling*-a lagin bakoitzari genotipoa ezartzea da.



17 irudia. Taqman Genotyper softwarearen bitartez cluster eta calling analisisien adierazpena. AA indibiduok gorrix, AG berdez eta GG urdinez adierazten ziren. Genotipazioa akatsak izan zituzten indibiduok horiz eta zuriak urdin argiz.

Genotipazioan zehar errepikatutako 10 lagin kontrol sartu ziren kontrol moduan. Fase honetan, zenbait SNP analitik baztertu ziren: transmisio aleliko mendelianoan akatsak eta genotipo diskordanteak zituztenak baztertu ziren.

3.3 MIRNA GENEEN SNPEN AZTERKETA

3.3.1 MIRNA GENEN ETA SNP-HAUTAKETA

OS pediatrikoaren suszeptibilitatean miRNAen adierazpen aldaketak aztertu zituen ikerketa lanik ez zen aurkitu. Beraz, pre-miRNA guztien aldakortasun genetikoak aztertu zen, honakoa kontuan izanda:

1. Pre-miRNAen *seed* gunean dauden SNPak miRNA-mRNA elkarrekintza desorekatu dezake edota miRNA-en itu geneak aldatu.
2. Pre-miRNAen dauden SNPak bere prozesamenduan edota miRNA-mRNA elkarrekintza desorekatu ere (141).

3. miRNAk gene kopuru handia erregulatu ditzakete, eta ondorioz, osteosarcoma pediatrikoaren arriskuan parte hartzen duten geneen erregulazioan inplikaturik egon daitezke miRNAk.

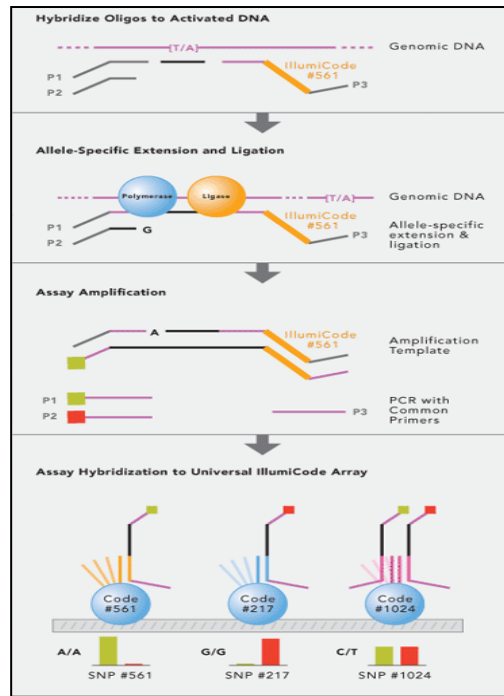
4. pre-miRNA guztietan dauden SNP (AMM %1 baino handiagoa) kopurua.

Deskribatutako pre-miRNA guztiak miRBase datubasetik (<http://www.mirbase.org/>) (bilaketaren amaiera-data: 2013 Martxoa) lortu genituen eta miRNASNIPER datubasearen (<http://www.integratome.com/miRNAs-SNIPER/>) bitartez, pre-miRNA guztietatik polimorfikoak zirenak adierazten zigun. Ondoren, SNP guztiak dbSNP datubasean (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) bilatu genituen AMM-a topatzeko. Populazio kaukasikoan AMMa %1 (AMM > 0,01) zuten SNPak aukeratu genituen.

3.3.2 PRE-MIRNA GENEEN SNP GENOTIPAZIOA

Pre-miRNAtan dauden SNPen genotipaziorako Illumina etxeko VeraCode-ko GoldenGate teknologia erabili zen Centro Nacional de Genotipado-n (CeGen-ISCI) burutua. Plataforma honek PCR multiplex entseguak egitea ahalbidetzen du. PCR multiplex bidez SNP kopuru handia prozesatu daitezke aldi berean (1536 baino gehiago) hori dela eta denbora, errektibo kopurua eta prozesurako beharrezko material kopurua murrizten da.

GoldenGate entseguak zenbait pausu dauzka. Lehenik eta behin, DNA biotina edo Streptavidinarekin (250ng DNA 50 ng/μL-tan) markatzen da. Marka hau hurrengo pausuan SNP bakoitzerako hasle espezifikoak DNArri lotzeko beharrezkoa da. Zehazki, 3 hasle diseinatzen dira: haietako bi espezifikoak dira SNParen aleloentzat (ASO, *allele-specific oligonucleotide*) eta gainontzeko haslea SNParen locusetik zenbait base ur-behera lotzen da (LSO, *locus-specific oligonucleotide*). LSO hasleak SNP bakoitza identifikatzen duen kodea du. Hurrengo pausua ASO hasletatik LSO haslera luzatzea da hasle unibertsalekin egindako PCR bidez. Hasle hauek koloratzaile ezberdinekin tindatuta daude ASO bakoitzerako (Cy-3 eta Cy-5). Horrela, SNPen alelo bakoitza identifikatu daitezke. Produktu hauek matrize edo euskarri batera lotuz SNP bakoitza seinale fluoreszentearen bitartez analizatu daitezke (18. irudia).



18. irudia. GoldenGate entseguaren eskema.

3.3.3 MIRNAEN BIGARREN MAILAKO EGITURAREN IRAGARPENAREN ANALISIA *IN SILICO*

SNPeK miRNA egituran sor ditzaketen aldaketak iragartzeko *in silico* analisisa egin genuen miRNASNP tresna bioinformatikoa (versión 2) (<http://www.bioguo.org/miRNASNP/>) erabiliz.

4. ANALISI ESTATISTIKOAK

Lehenik eta behin, genotipazio arrakasta kalkulatu zen SNP bakoitzerako Haploview software-a erabiliz (4.2 bertsioa).

Asoziazio analisisa egin baino lehen SNPeK HWO betetzen zuten kalkulatu genuen. HWO kontrol populazioan kalkulatu zen da populazio orokorraren aleloen frekuentziak dituzten ala ez zehazteko. HWOren printzipioak populazio orokorrean topatu behar genituzken genotipoen frekuentziak zehazten dizkigu. Hala ere, badaude populazio orokorrean gerta daitezken zenbait fenomeno genotipoen frekuentzien desbidapena gertatzeko: genotipazioan akatsak, odolkidetasuna indibiduen artean edo aleloen hautespen fenomenoren bat. HWO χ^2 testaren edo Fisher test zehatzaren bitartez kalkulatu zen. Adierazgarritasun maila 0,05 izan zen.

Asoziazio analisiaren magnitudea odds ratio (OR) eta %95ko konfidantza tartearen (%95KT) bitartez estimatu genuen. Frekuentzia genotipikoen konparaketa kasu eta kontrolen artean erregresio logistikoaren bitartez kalkulatu genuen 5 herentzia eredu genetiko erabiliz: alelikoa, kodominantea, dominantea, errezesiboa eta aditiboa. Eredu alelikoak aleloetako batek arriskua sortzen duela postulatu du; eredu kodominanteak genotipo bakoitzak gaixotasunarekiko arrisku ezberdina (baina ez gehigarria) ematen diola postulatu du; eredu dominanteak arrisku aleloaren kopia bakarra edukitzea nahikoa da arriskua aldatzeko; eredu errezesiboan arrisku aleloaren bi kopiak beharrezkoak dira arriskua aldatzeko; eredu aditiboak aleloek efektu gehigarria dutela postulatu dute (142). Frekuentzia alelikoen konparaketa kasu eta kontrolen artean χ^2 testaren bitartez kalkulatu genuen. Bai frekuentzia genotipiko bai alelikoetan adierazgarritasun maila 0.05 finkatu zen. Aztertzen zen honetan zen SNP kopurua altua zenez eta beraz, konparazio kopuru handia egiten zenez positibo faltsuak agertzea probableagoa da. Hori dela eta, adierazgarritasun balioak bi metodo bidez zuzendu ziren: False discovery rate (FDR) metodoa, SNP adierazgarrien kopurua kontuan hartzen dituen eta Bonferroni metodoa, aztertutako SNP guztiak kontuan hartzen dituen. Azken metodo hau zorrotzagoa da (143). Analisi hauek R (“the R Foundation for Statistical Computing” 3.0.3 bertsioa) software estatistikoarekin egin ziren SNPAssoc liburutegi erabiliz.

EMAITZAK

1. LITERATURAN OSREN SUSZEPTIBILITATEAREKIN ASOZIATUTAKO SNPEN BALIDAZIOA

OSren arriskua aztertu zuten gene kandidatu artikuluen bilaketa egin ondoren, rs2279744 eta rs1690916 SNPak *MDM2* genean eta rs231775 SNPa *CTLA4* genean OSren suszeptibilitatearekin bi artikuluko bakoari gehiagotan asoziatutako SNP bakarrak dira. Hiru SNP hauek OSren arriskuaren markatzaile potentzial bakarrak dira, hori dela eta, SNP hauen balidatzea erabaki genuen.

1.1 *MDM2* GENEAREN rs1690916 ETA rs2279744 SNPAREN OS ARRISKUAREN ASOZIAZIO-ANALISIA

MDM2 genearen rs1690916 eta rs2279744 SNPak OSren arriskuarekin asoziatuta zeuden ala ez egiaztatzeko Europako OS populazioetan (Espainia eta Eslovenia) kasu-kontrol azterketa.

1.1.1 LAGINA

OS 139 kasu (n= 99 espainiar eta n=40 esloveniar) eta haien kontrolak (n=167 eta n=92, hurrenez hurren) aztertu ziren. Pazienteen batazbesteko adina 14,69 urte (3-69 urteko heina). OS kasuetan gizonezko gehiago zeuden 1,16:1 proportzioan (12. taula).

12. taula. *MDM2* genearen azterketan parte hartu duten OS pazienteen eta kontrolen adin eta sexu banaketa.

	Totalak	Kontrolak	Kasuak
Parte-hartzaileak (n)	398	259	139
Jatorria (n;%)			
Espainia	266 (66,83)	167 (64,48)	99 (71,22)
Eslovenia	132 (33,17)	92 (35,52)	40 (28,78)
Adina (bte; de)*			
Espainia	-	42,29 (9,97)	14,69 (5,13)
Eslovenia	-	46,52 (9,24)	23 (15,89)
Sexua (e/g/de)*			
Espainia	100/145/21	61/91/15	39/54/6
Eslovenia	52/79/1	31/61	21/18/1

Laburdurak: n, norbanako kopurua; de, desbiderapen estandarra; e, emakumeak; g, gizonezkoak; de, daturik ez; bte, batzbestea. * Partehartzaile batzuren adin eta sexu datuak falta ziren.

1.1.2 GENOTIPAZIO ARRAKASTA

Genotipazio arrakasta %96,5koa zen rs1690916 polimorfismoarentzat (126 kasu y 258 kontrol) eta %94,5koa rs2279744 polimorfismoarentzat (120 kasu eta 256 kontrol). Frekuentzia genotipikoak control taldean HW orekan zeuden ($p > 0,05$).

1.1.3 rs1690916 SNPA ETA OS ARRISKUAREN ASOZIAZIO-ANALISIA

MDM2 genearen rs1690916 SNParen asoziazioa ez zen esangarria ez populazio espainiarrean ezta esloveniarrean ere frekuentzia alelikoen bitartez kalkulatu zenean. Populazio biak gehitzean ere ez zen asoziazio esangarririk topatu (13. Taula).

13. taula *MDM2* genearen rs1690916 polimorfismoaren eta OS arriskuaren maiztasun alelikoen bidezko asoziazio analisiaren emaitzak.

Populazioa	AM	MAF	Aleloak	N (%) kontrolak	N (%) kasuak	OR (%95KT)	P
España	A	0,34	G	220 (65,9)	125 (63,1)	1,13 (0,78-1,63)	0,57
			A	114 (34,1)	73 (36,9)		
			Totalak	334 (100)	198 (100)		
Eslovenia	A	0,43	G	103 (56,6)	23 (42,6)	1,76 (0,95-3,25)	0,09
			A	79 (43,4)	31 (57,4)		
			Totalak	182 (100)	54 (100)		
Todas	A	0,37	G	323 (62,4)	148 (58,73)	1,18 (0,86-1,62)	0,30
			A	193 (37,26)	104 (4,13)		
			Totalak	516 (100)	252 (100)		

Laburdurak: AM, kontrolen maiztasun txikikoena duen aleloa; MAF, alelo txikiaren maiztasuna; OR, Odds Ratio; KT, Konfidantza-tartea.

Bestalde, frekuentzia genotipikoen bidezko asoziazio-analisiak ere ez zuten asoziaziorik topatu ez populazio espainiarrean ezta esloveniarrean ($p > 0,05$, eredu genetiko guztietan). Populazio biak gehitzean ere ez zen asoziazio esangarririk topatu (14. Taula).

Tabla 14. MDM2 genearen rs1690916 polimorfismoaren eta OS arriskuaren maiztasun genotipikoen bidezko asoziazio analisiaren emaitzak.

Populazioa	AM	Genotipoa	N(%)kontrolak	N (%) kasuak	OR (IC 95%) kod	P kod	OR(IC 95%) errez	P errez	OR(IC 95%) dom	P dom	OR(IC 95%) log	P log
Espainia	A	GG	73 (43,7)	38 (38,4)	1							
		GA	74 (44,3)	49 (49,5)	1,27 (0,75-2,17)	0,68	GG/GA		GG			
		AA	20 (12,0)	12 (12,1)	1,15 (0,51-2,61)		AA 1,01 (0,47-2,17)	0,97	GA/AA 1,25 (0,75-2,07)	0,39	1,13 (0,78-1,63)	0,52
		Totalak	167 (100)	99 (100)								
Eslovenia	A	GG	26 (28,6)	3 (11,1)	1							
		GA	51 (56,0)	17 (63,0)	2,89 (0,78-10,76)	0,11	GG/GA		GG			
		AA	14 (15,4)	7 (25,9)	4,33 (0,97-19,43)		AA 1,92 (0,69-5,40)	0,22	GA/AA 3,20 (0,89-11,55)	0,05	1,98 (0,99-3,96)	0,05
		Totalak	91 (100)	27 (100)								
Biak	A	GG	99 (38,4)	41 (32,5)	1							
		GA	125 (48,4)	66 (52,4)	1,27 (0,80-2,04)	0,53	GG/GA		GG			
		AA	34 (13,2)	19 (15,1)	1,35 (0,69-2,63)		AA 1,17 (0,64-2,15)	0,61	GA/AA 1,29 (0,82-2,02)	0,26	1,19 (0,86-1,63)	0,29
		Totalak	258 (100)	126 (100)								

Laburdurak: AM, kontrolen maiztasun txikikoena duen aleloa; OR, Odds Ratio; KT, Konfidantza-tartea; kod, kodominantea; dom, dominantea; errez, errezesiboa; log, log-aditiboa.

1.1.4 rs2279744 SNPA ETA OS ARRISKUAREN ASOZIAZIO-ANALISIA

MDM2 genearen rs2279744 SNParen asoziazioa ez zen esangarria ez populazio espainiarrean ezta esloveniarrean ere frekuentzia alelikoen bitartez kalkulatu zenean. Populazio biak gehitzean ere ez zen asoziazio esangarririk topatu ($p > 0,05$) (15. Taula).

15. taula *MDM2* genearen rs2279744 polimorfismoaren eta OS arriskuaren maiztasun alelikoen bidezko asoziazio analisiaren emaitzak.

Populazioa	AM	MAF	Aleloak	N (%) kontrolak	N (%) kasuak	OR (%95KT)	P
Espainia	G	0,38	T	202 (61,6)	125 (66,5)	0,81 (0,55-1,18)	0,30
			G	126 (38,4)	63 (33,5)		
			Totalak	328 (100)	188 (100)		
Eslovenia	G	0,36	T	118 (64,1)	36 (69,2)	0,79 (0,38-1,60)	0,62
			G	66 (35,9)	16 (30,8)		
			Totalak	184 (100)	52 (100)		
Biak	G	0,38	T	320 (62,5)	161 (67,1)	0,81(0,58-1,14)	0,25
			G	192 (37,5)	79 (32,9)		
			Totalak	512 (100)	240 (100)		

Laburdurak: AM, kontrolen maiztasun txikikoena duen aleloa; MAF, alelo txikiaren maiztasuna; OR, Odds Ratio; KT, Konfidantza-tartea.

Bestalde, frekuentzia genotipikoen bidezko asoziazio-analisek ere ez zuten asoziaziorik topatu ez populazio espainiarrean ezta esloveniarrean ($p > 0,05$, eredu genetiko guztietan). Populazio biak gehitzean ere ez zen asoziazio esangarririk topatu (16. Taula).

16.taula *MDM2* genearen rs2279744 polimorfismoaren eta OS arriskuaren maiztasun genotipikoen bidezko asoziazio analisiaren emaitzak.

Populazioa	AM	Genotipoa	N (%) kontrolak	N (%) kasuak	OR (IC 95%) kod	P kod	OR(IC 95%) errez	P errez	OR(IC 95%) dom	P dom	OR(IC 95%) log	P log
Espainia	G	TT	65 (39,6)	44 (46,8)	1							
		GT	72 (43,9)	37 (39,4)	0,76 (0,44-1,32)	0,53	TT/GT		TT			
		GG	27 (16,5)	13 (13,8)	0,71 (0,33-1,53)		GG 0,81 (0,40-1,67)	0,57	GT/GG 0,75 (0,45-1,24)	0,26	0,82 (0,57-1,18)	0,29
		Total	164 (100)	94 (100)								
Eslovenia	G	TT	40 (43,5)	11 (42,3)	1							
		GT	38 (41,3)	14 (53,8)	1,34 (0,54-3,31)	0,19	TT/GT		TT			
		GG	14 (15,2)	1 (3,8)	0,26 (0,03-2,20)		GG 0,22 (0,03-1,78)	0,09	GT/GG 1,05 (0,43-2,53)	0,92	0,80 (0,42-1,54)	0,50
		Total	92 (100)	26 (100)								
Biak	G	TT	105 (41)	55 (45,8)	1							
		GT	110 (43)	51 (42,5)	0,89 (0,56-1,41)	0,46	TT/GT		TT			
		GG	41 (16)	14 (11,7)	0,65 (0,33-1,30)		GG 0,69 (0,36-1,33)	0,25	GT/GG 0,82(0,53-1,27)	0,38	0,83 (0,61-1,13)	0,23
		Total	256 (100)	120 (100)								

Laburdurak: AM, kontrolen maiztasun txikikoena duen aleoa; OR, Odds Ratio; KT, Konfidantza-tartea; kod, kodominantea; dom, dominantea; errez, errezesiboa; log, log-aditiboa.

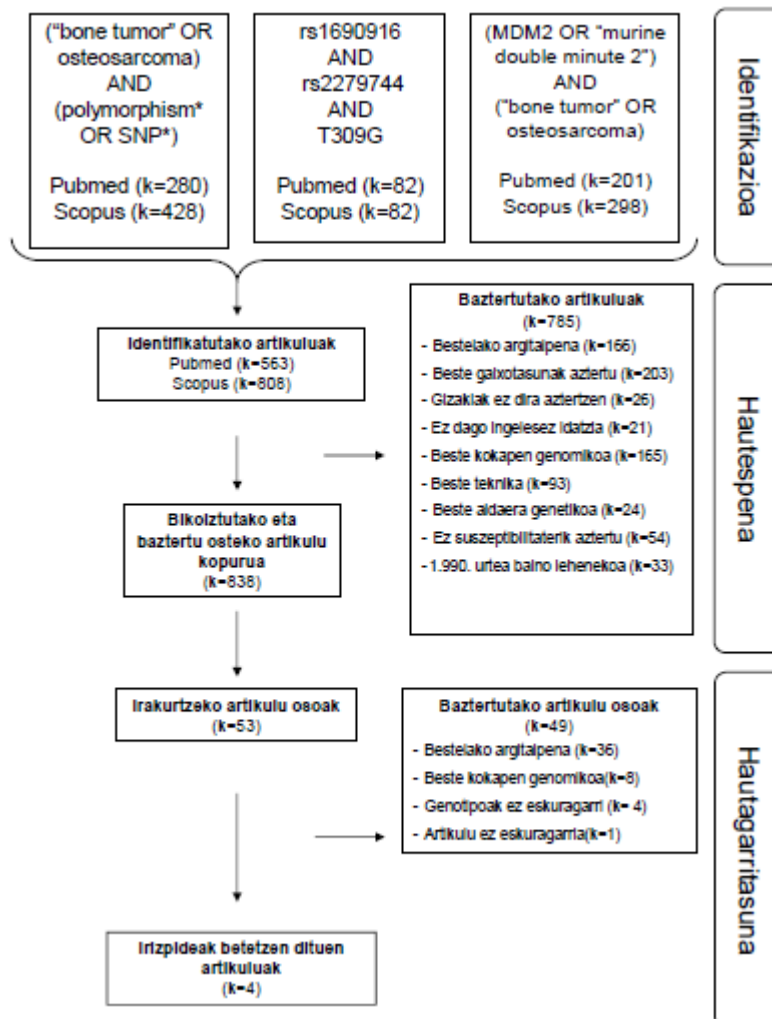
Laburbilduz, ez zen asoziazio esangarririk topatu MDM2 geneen rs1690916 eta rs2279744 SNPen eta OS arriskuaren artean. Eraitza hauek literaturan topatutakoekin kontraesanean zeuden (33, 35), baita duela gutxi bi SNP hauek aztertzen zituen MAREkin (151).

Hori dela eta, *MDM2* genearen polimorfismo hauek OSren arriskuarekin aztertutako artikuluen irakurketa kritikoa egitea erabaki genuen. Horrez gain, azterketa hauekin eta genotipatutako populazioekin meta-analisi berria egitea erabaki genuen.

1.2 MDM2 GENEAREN rs1690916 ETA rs2279744 SNPEN BILAKETA BIBLIOGRAFIKOA ETA META-ANALISIA

1.2.1 rs1690916 ETA rs2279744 SNPEN ETA OS SUSZEPTIBILITATEAREN AZTERKETEN BILAKETA BIBLIOGRAFIKOA

Bilaketa bibliografikoa *Pubmed* eta *Scopus* datubaseen bitartez egin genuenean 1371 artikulu identifikatu genituen. Duplikazioak kendu ostean 838 artikulu geratu ziren. Artikuluen laburpenak irakurri ostean 785 artikulu baztertu ziren inklusio irizpideak betetezen ez zituztelako, 53 artikulu oso irakurriz. Hauetatik, lau artikuluk rs1690916 edo/eta rs2279744 OSren arriskuaren asoziazioa aztertu zuten (19. Irudia).



19.irudia. Hautatutako artikuluen fluxu-diagrama.

1.2.2 META-ANALISIA

rs1690916 eta rs2279744 SNPen meta-analisirako sei populazio erabili ziren: haietatik lau bilaketa bibliografikotik lortu ziren (errusiarra, amerikarra, australiarra eta italiarra) eta aurreko asoziazio-analisiko emaitzak (populazio espainiarra eta esloveniarrak).

1.2.2.1 rs1690916 SNParen meta-analisia

rs1690916 SNParen zatitzaile jatorri errusiarra, amerikarra, espainiarra eta esloveniarrak zuten populazioak erabili ziren. Genotipoen banaketa kontrolatan HW orekan zeuden ($p > 0,05$). SNP hau aztertzen zuten artikuluak kalitate eskala gainditu zuten (> 5 balioa) (1. Taula osagarria).

Maiztasun alelikoen bitartez egindako asoziazio-analisan emaitza esangarria izan zuen populazio bakarra, amerikarra izan zen ($p = 0,002$) (17. Taula). Populazio honetan, A aleloak OS arriskua txikitzen zuen (OR=0,61; %95KT: 0,45-0,84).

17. taula MDM2 genearen rs1690916 SNParen maiztasun alelikoen bidezko asoziazio-analisia meta-analisiko artikuluetan.

Populazioa	N _{kontrolak}	N _{kasuak}	AM	Fr _{kontrolak}	Fr _{kasuak}	OR (%95KT)	P	Erref	Urtea
España	167	99	A	0,34	0,37	1,13 (0,78-1,63)	0,57		2015 (PE)
Eslovenia	91	27	A	0,43	0,57	1,76 (0,95-3,25)	0,08		2015 (PE)
Rusia	86	24	A	0,47	0,31	0,51 (0,26-1,01)	0,06	(36)	2012
EEUU	1416	96	A	0,42	0,31	0,61 (0,45-0,84)	0,002*	(35)	2011

Laburdurak: AM, kontrolen maiztasun txikikoena duen aleloa; MAF, alelo txikiaren maiztasuna; OR, Odds Ratio; KT, Konfidantza-tartea; N, kopurua; Fr., maiztasun alelikoa; PE: Gure azterketa; Erref: Erreferentzia; * Esangarria.

Maiztasun genotipikoen analisan, bi populazioak (amerikarra eta errusiera) emaitza esangarriak izan zituen (18. Taula). Populazio amerikarraren kasuan, rs1690916 esangarria izan zen eredu genetikoz guztietan. Emaitzarik esangarriena eredu log-aditiboan lortu zen (AA vs AG vs GG). AA genotipoak OS arriskua murrizten zuen OR=0,61 (%95KT: 0,45-0,84; $p = 0,002$). Populazio errusiarrean GA/AA genotipoak OS arriskua murrizten zuen eredu dominantean (OR= 0,37; %95KT: 0,14-0,93; $p = 0,04$).

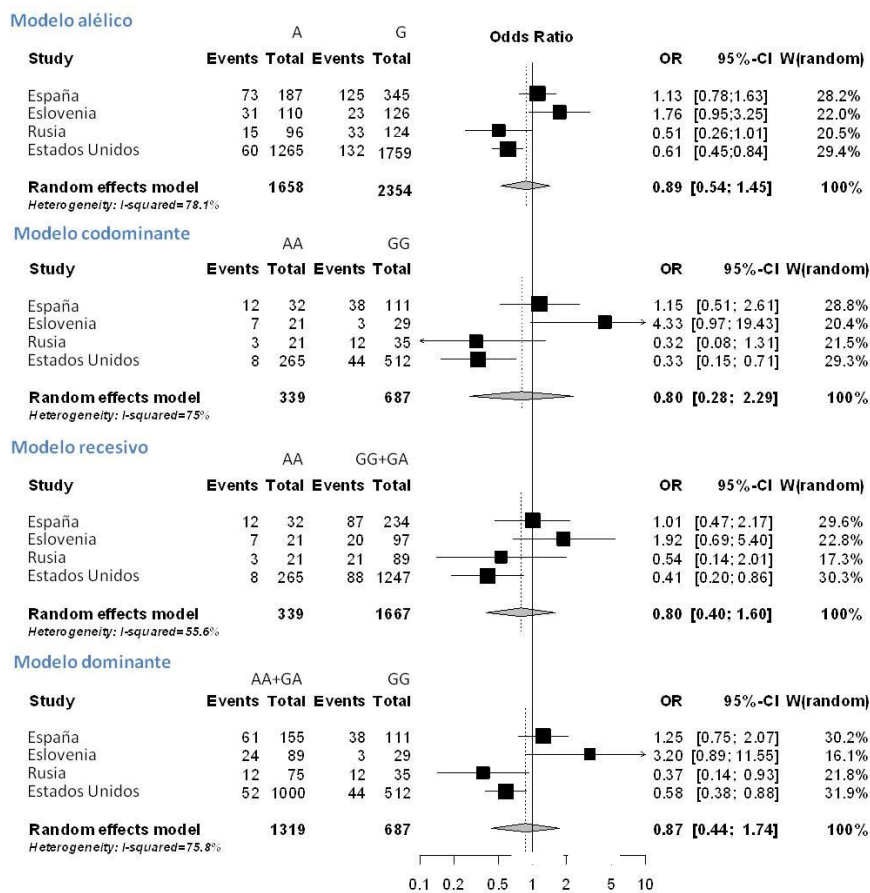
18 taula. *MDM2* genearen rs1690916 polimorfismoaren eta OS arriskuaren maiztasun genotipikoen bidezko asoziazio analisiaren emaitzak meta-analisen artikuluetan.

Populazioa	AM	Genotipoa	N(%) kontrolak	N(%) kasuak	OR (IC 95%) kod	P kod	OR(IC 95%) errez	P errez	OR(IC 95%) dom	P dom	OR(IC 95%) log	P log	Eref	Urtea
Espainia	A	GG	73 (43,7)	38 (38,4)	1									2015 (PE)
		GA	74 (44,3)	49 (49,5)	1,27 (0,75-2,17)	0,67	GG/GA	0,97	GG	0,39	1,13 (0,78-1,63)	0,52		
		AA	20 (12,0)	12 (12,1)	1,15 (0,51-2,61)		AA 1,01 (0,47-2,17)		GA/AA 1,25 (0,75-2,07)					
		Totalak	167 (100)	99 (100)										
Eslovenia	A	GG	26 (28,6)	3 (11,1)	1									2015 (PE)
		GA	51 (56,0)	17 (63,0)	2,89 (0,78-10,76)	0,11	GG/GA	0,22	GG	0,05	1,98 (0,99-3,96)	0,05		
		AA	14 (15,4)	7 (25,9)	4,33 (0,97-19,43)		AA 1,92 (0,69-5,40)		GA/AA 3,20 (0,89-11,55)					
		Totalak	91 (100)	27 (100)										
Errusia	A	GG	23 (26,7)	12 (50,0)	1									(36) 2012
		GA	45 (52,3)	9 (37,5)	0,38 (0,14-1,04)	0,10	GG/GA	0,33	GG	0,04	0,51 (0,25-1,01)	0,05		
		AA	18 (20,9)	3 (12,5)	0,32 (0,08-1,31)		AA 0,54 (0,14-2,01)		GA/AA 0,37 (0,14- 0,93)					
		Totalak	86 (100)	24 (100)										
AEB	A	GG	468 (33,1)	44 (45,8)	1									(35) 2011
		GA	691 (48,8)	44 (45,8)	0,68 (0,44-1,05)	0,006	GG/GA	0,008	G/G	0,01	0,61 (0,45-0,84)	0,002		
		AA	257 (18,1)	8 (8,3)	0,33 (0,15-0,71)		AA 0,41 (0,20-0,86)		GA/AA 0,58 (0,38-0,88)					
		Totalak	1416 (100)	96 (100)										

Laburdurak: AM, kontrolen maiztasun txikikoena duen aleloa; OR, Odds Ratio; KT, Konfidantza-tartea; kod, kodominantea; dom, dominantea; errez, errezesiboa; log, log-aditiboa, Eref, Erreferentzia, PE: Gure azterketa;

Hortaz, populazio amerikarra OSren arriskuarekin asoziatuak agertu zen eredu genetiko guztietan (18.taula).

Maiztasun alelikoen bidezko meta-analisan, A aleloak OS arriskua populazioaren arabera areagotu edo murrizten zela behatu genuen; Espainiako eta Esloveniako populazioetan A aleloak arriskua ematen zuen bitartean (OR>1), Errusia eta Ameriketako populazioetan A aleloa babesekoa zen (OR<1). Pisuari (W balioa eta karratu batekin adierazita *forest plot*-ean) dagokiola eredu alelikoan, populazio amerikarrak (%29,4) eta espainiarrak (%28,2) pisurik handiena zuten meta-analisan (20. Irudia).



20.irudia rs1690916 polimorfismoaren meta-analisia.

Polimorfismo honen meta-analisan heterogeneitatea altua zen (>75) eredu alelikoan, kodominantean eta dominantean (20. Irudia). Heterogeneitatearen jatorria zein zen jakiteko influentzia-analisia egin genuen. Anlisi honen arabera, ez zegoen OR balio globalean eraginik zuen populaziorik beraz, populazioak ez zuten modu indibidualean heterogeneitatean eragiten (3. Taula osagarria).

Meta-analisiaren azken emaitzaren arabera, rs1690916 polimorfismoa eredu genetiko guztietan OS arriskuarekin asoziatuta ez zegoela adierazten zuen (20. Irudia).

1.2.2.2 rs2279744 SNParen meta-analisia

rs2279744 SNParen meta-analisan jatorri amerikarra, australiarra, italiarra, espainiarra eta esloveniarrak zuten populazioak erabili ziren. Genotipoen banaketa kontrolatan HW orekan zeuden ($p > 0,05$). Artikulu guztiek kalitate-analisia gainditu zuten populazio australiarrak izan ezik. Kalitatearen ebaluazioaren (balioa=4) arabera artikulu honetan erabilitako kontrol taldearen kalitate baxua dela eta (2. Taula osagarria).

Maiztasun alelikoen bitartez egindako asoziazio-analisan emaitza esangarria izan zuen populazio bakarra, italiarra izan zen ($p = 0,002$) (19. Taula). Populazio honetan, G aleloak OS arriskua handitzen zuen (OR=1,53; %95KT: 1,16-2,02).

19. taula MDM2 genearen rs2279744 SNParen maiztasun alelikoen bidezko asoziazio-analisia meta-analisiko artikuluetan.

Populazioa	N _{kontrolak}	N _{kasuak}	AM	Fr _{kontrolak}	Fr _{kasuak}	OR (%95KT)	P	Erref	Urtea
España	164	94	G	0,38	0,33	0,81 (0,55-1,19)	0,29		2015 (PE)
Eslovenia	92	26	G	0,36	0,31	0,80 (0,38-1,60)	0,62		2015 (PE)
AEB	1416	95	G	0,36	0,42	1,31 (0,96-1,78)	0,09	(35)	2011
Australia	37	17	G	0,3	0,38	1,46 (0,56-3,71)	0,39	(34)	2011
Italia	250	201	G	0,34	0,44	1,53 (1,16-2,02)	0,002*	(33)	2011

Laburdurak: AM, kontrolen maiztasun txikikoena duen aleloa; MAF, alelo txikiaren maiztasuna; OR, Odds Ratio; KT, Konfidantza-tartea; N, kopurua; Fr., maiztasun alelikoa; PE: Gure azterketa; Erref: Erreferentzia; 1: Esangarria.

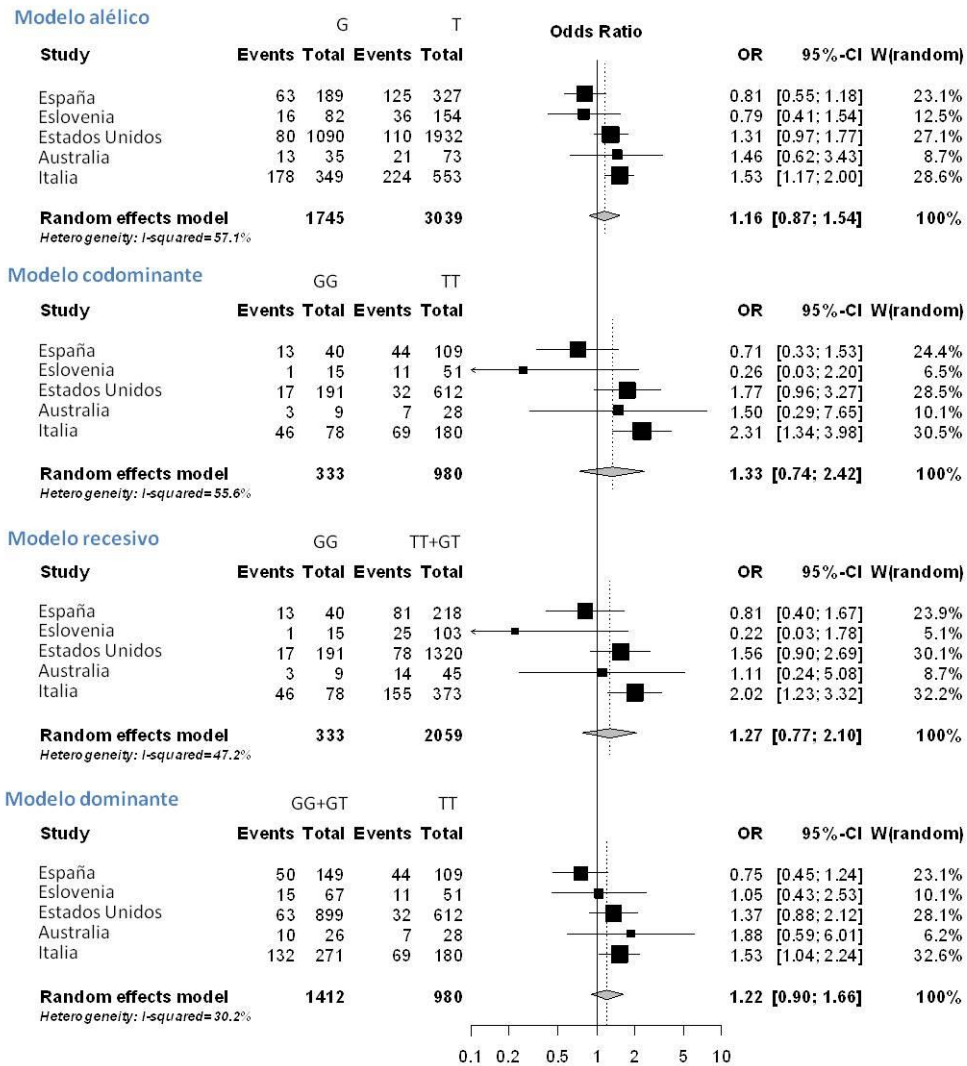
Era berean, maiztasun genotipikoen bidezko analisian, populazio italiarrak emaitza esangarriak erakutsi zituen eredu genetiko guztietan (OR>1; $p < 0,05$) (20. taula). Eredu genetikorik esangarriena log-aditiboa izan zen aditibo (TT vs TG vs GG), non GG genotipoak OS arriskua areagotu zuen de OR=1,48 %95KT: 1,14-1,92; $p = 0,003$). Gainontzeko populazioak (espainiarra, esloveniarrak, amerikarra eta australiarra) ez zuten emaitza esangarririk izan ($p > 0,05$ eredu genetiko guztietan).

20. taula. MDM2 genearen rs2279744 polimorfismoaren eta OS arriskuaren frekuentzia genotipikoen bidezko asoziazio analisiaren emaitzak meta-analisiaren artikuluetan.

Populazioa	AM	Genotipoa	N(%) kontrolak	N(%) kasuak	OR (%95KT) kod	P kod	OR(%95KT) errez	P errez	OR(%95KT) dom	P dom	OR(%95KT) log	P log	Eref	Urtea
Espainia	G	TT	65 (39,6)	44 (46,8)	1	0,53	TT/GT GG 0,81 (0,40-1,67)	0,57	TT GT/GG 0,75 (0,45-1,24)	0,26	0,82 (0,57-1,18)	0,29		2015 (PE)
		GT	72 (43,9)	37 (39,4)	0,76 (0,44-1,32)									
		GG	27 (16,5)	13 (13,8)	0,71 (0,33-1,53)									
		Totalak	164 (100)	94 (100)										
Eslovenia	G	TT	40 (43,5)	11 (42,3)	1	0,19	TT/GT GG 0,22 (0,03-1,78)	0,09	TT GT/GG 1,05 (0,43-2,53)	0,92	0,80 (0,42-1,54)	0,50		2015 (PE)
		GT	38 (41,3)	14 (53,8)	1,34 (0,54-3,31)									
		GG	14 (15,2)	1 (3,9)	0,26 (0,03-2,20)									
		Totalak	92 (100)	26 (100)										
AEB	G	TT	580 (41,0)	32 (33,7)	1	0,19	TT/GT G/G 1,56 (0,90-2,69)	0,13	TT GT/GG 1,37 (0,88-2,12)	0,16	1,32 (0,98-1,78)	0,07	(35)	2011
		GT	662 (46,8)	46 (48,4)	1,26 (0,79-2,00)									
		GG	174 (12,3)	17 (17,9)	1,77 (0,96-3,27)									
		Totalak	1416 (100)	95 (100)										
Australia	G	TT	21 (56,8)	7 (41,2)	1	0,52	TT/GT GG 1,11 (0,24-5,08)	0,90	TT GT/GG 1,88 (0,59-6,01)	0,29	1,35 (0,63-2,87)	0,44	(34)	2011
		GT	10 (27,0)	7 (41,2)	2,10 (0,58-7,63)									
		GG	6 (16,2)	3 (17,6)	1,50 (0,29-7,65)									
		Totalak	37 (100)	17 (100)										
Italia	G	TT	111 (44,4)	69 (34,3)	1	0,009*	TT/GT GG 2,02 (1,23-3,32)	0,005*	TT GT/GG 1,53 (1,04-2,24)	0,03*	1,48 (1,14-1,92)	0,003*	(33)	2009
		GT	107 (42,8)	86 (42,8)	1,29 (0,86-1,95)									
		GG	32 (12,8)	46 (22,9)	2,31 (1,34-3,98)									
		Totalak	250 (100)	201 (100)										

Laburdurak: AM, kontrolen maiztasun txikikoena duen aleloa; OR, Odds Ratio; KT, Konfidantza-tartea; kod, kodominantea; dom, dominantea; errez, errezesiboa; log, log-aditiboa, Eref, Erreferentzia, PE: Gure azterketa;.,

Maiztasun alelikoen bidezko meta-analisan, G aleloa arrisku aleloa izan zen $OR > 1$, populazio espainiarrean eta esloveniarran izan ezik non G alelo babesekoa izan zen ($OR < 1$). MA pisu gehiena izan zuten populazioak, italiarra (%28,6), amerikarra (%27,1) eta espainiarra (%23,1) izan ziren. Heterogeneitatea %57,1-koa izan zen (21. Irudia).

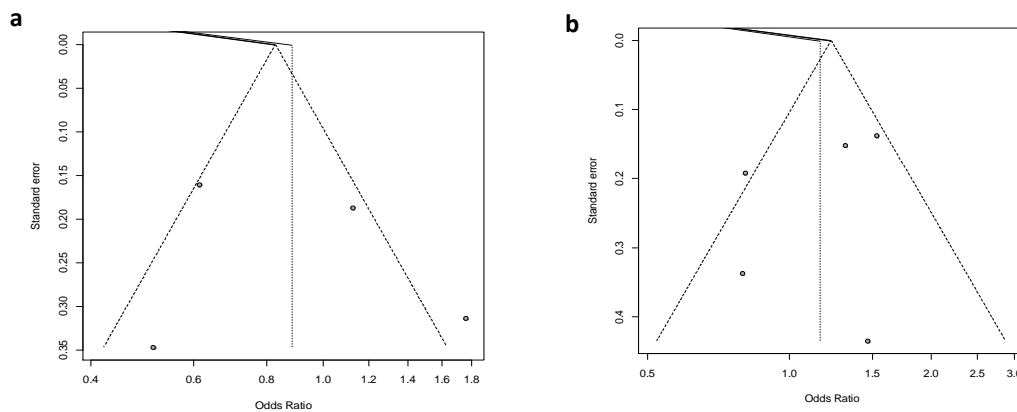


21.irudia rs2279744 polimorfismoaren meta-analisia.

MAren azken emaitzaren arabera, rs2279744 polimorfismoa eredu genetiko guztietan OS arriskuarekin asoziatuta ez zegoela adierazten zuen (21. Irudia).

1.2.3 PUBLIKAZIOAREN ALBORAPENA

Publikazioaren alborapena Egger-ren testaren bitartez aztertu zen. Test honen bitartez, emaitza positibo (asoziazioa topatu dutenen artean) eta emaitza negatiboen (asoziazioa topatu ez dutenen artean) arteko simetría neurtzen du. Kasu honetan, ez genuen asimetriarik topatu *funnel plot*-etan (22. Irudia), Egger-ren test-ak ez zirelako esangarriak izan ($p > 0,05$), (1. Eta 2. Irudi osagarriak). Emaitza hauen arabera, meta-analisietan ez zegoen publikazioaren alborapenik.



22.irudia Egger-ren test-en Funnel plots-ak maiztasun alelikoen konparaketetarako. a) rs1690916 SNPrako konparaketa A vs G. b) rs2279744 SNPerako konparaketa G vs T.

1.3 *CTLA4* GENEAREN rs231775 SNPAREN ETA OS SUSZEPTIBILITATEAREN ASOZIAZIO-ANALISIA

CTLA4 genearen rs231775 SNPak OS arriskuan duen papera aztertzeko OS populazio batean kasu-kontrol asoziazio-analisia egin genuen.

1.3.1 LAGINA

Populazio honetan 99 OS paziente eta 125 kontrol zeuden. Populazio honen ezaugarri demografikoak 21.taulan adierazi dira.

21. taula *CTLA4* genearen azterketan parte hartu duten OS pazienteen eta kontrolen adin eta sexu banaketa.

	Kontrolak	Kasuak
Pazienteak (n;%)	125	99
Adina* (bte, de)	57,2 ± 12,64	13,96 ± 5,06
Sexua* (n; %)		
Gizonezkoak	68 (57,1)	60 (60,60)
Emakumezkoak	51 (42,9)	38 (38,38)

Laburdurak: n, norbanako kopurua; de, desbiderapen estandarra; e, emakumeak; g, gizonezkoak; de, daturik ez; bte, batzbestea. * Partehartzaile batzuren adin eta sexu datuak falta ziren (6 kontrol eta kasu bat).

1.3.2 GENOTIPAZIO ARRAKASTA

Genotipazio arrakasta %85,26koa izan zen (66 paziente eta 125 kontrol). Maiztasun genotipikoak kontrol populazioan HW orekan zeuden ($p>0,05$).

1.3.3 rs231775 SNPAREN ASOZIAZIO-ANALISIA

CTLA4 genearen rs231775 SNParen asoziazioa ez zen esangarria populazio espainiarrean frekuentzia alelikoen bitartez kalkulatu zenean ($p>0,05$) (22. Taula).

22.taula. *CTLA4* genearen rs231775 polimorfismoaren eta OS arriskuaren frekuentzia alelikoen bidezko asoziazio analisiaren emaitzak.

AM	MAF	Aleloak	N (%) kontrolak	N (%) kasuak	OR (%95KT)	P
G	0,38	G	93(37,2)	40(30,3)	A 1,36 (0,87-2,02)	0,21
		A	157(62,8)	93(70,5)		
		Total	250 (100)	132 (100)		

Laburdurak: AM, kontrolen maiztasun txikikoena duen aleloa; MAF, alelo txikiaren maiztasuna; OR, Odds Ratio; KT, Konfidantza-tartea.

Maiztasun genotipikoen bidezko asoziazio-analisiak emaitza estatistikoki esangarriak azaldu zituen bai eredu kodominante bai dominantean ($p > 0,05$) (23.taula). Emaitzik esangarriena eredu kodominantean azaltzen zen (AA vs AG y AA vs GG) (OR= 0,39, IC 95%: 0,21-0,74; $p=0,005$). Emaitza hauekin bat, eredu dominantean AG+GG genotipoak babesa ematen zuen (OR= 0,45, IC95%: 0,24-0,83).

23.taula. *CTLA4* genearen rs231775 polimorfismoaren eta OS arriskuaren maiztasun genotipikoen bidezko asoziazio analisiaren emaitzak.

AM	Genotipoa	N (%) kontrolak	N (%) kasuak	OR (IC 95%) kod	P kod	OR(IC 95%) errez	P errez	OR(IC 95%) dom	P dom	OR(IC 95%) log	P log
G	AA	37 (29,6)	32 (48,5)	1	0,005	AA/AG GG 2.40 (0,70-8,18)	0,16	AA AG/GG 0,45 (0,24-0,83)	0,010	0,65 (0,38-1,11)	0,11
	AG	83 (66,4)	28 (42,4)	0.39 (0,21-0,74)							
	GG	5 (4,0)	6 (9,1)	1,39 (0,39-4,98)							
	Total	125 (100)	66 (100)								

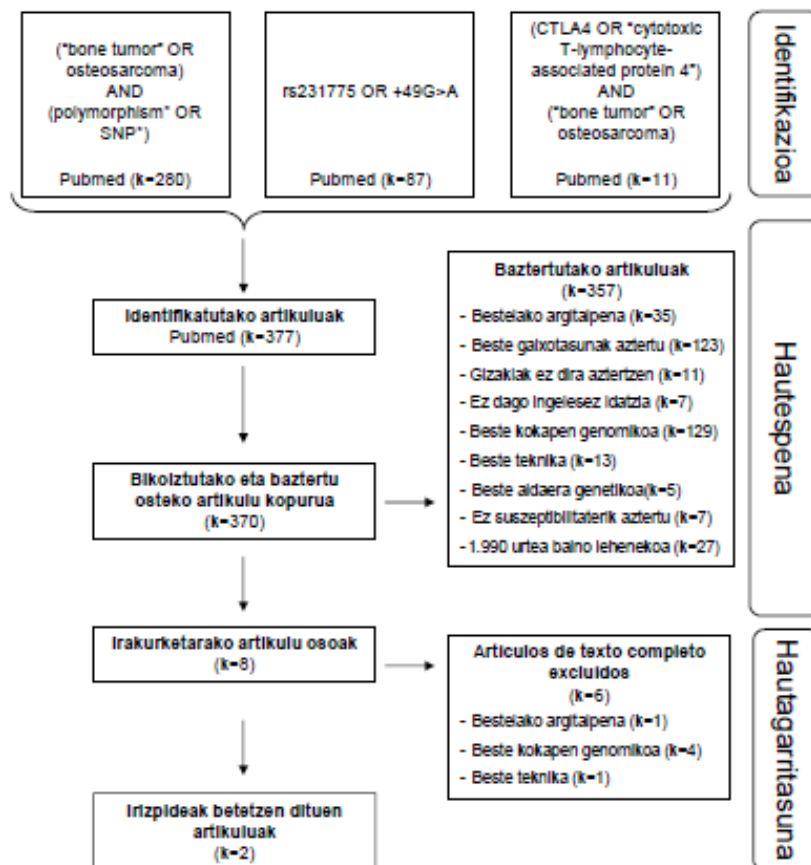
Laburdurak: AM, kontrolen maiztasun txikikoena duen aleloa; OR, Odds Ratio; KT, Konfidantza-tartea; kod, kodominantea; dom, dominantea; errez, errezesiboa; log, log-aditiboa.

Ondoren, bilaketa bibliografikoa eta fase horretan lortutako argitalpen guztiekin meta-analisia egin genuen.

1.4 CTLA4 GENEAREN rs231775_SNPEN BILAKETA BIBLIOGRAFIKOA ETA META-ANALISIA

1.4.1 rs231775 SNPAREN ETA OS SUSZEPTIBILITATEAREN AZTERKETEN BILAKETA BIBLIOGRAFIKOA

Bilaketa honetan 378 argitalpen identifikatu genituen. Argitalpen bikoiztuak baztertu ostean 378 artikulu genituen. Artikulu hauen laburpenak berrikusi ostean 357 baztertu ziren inklusio irizpideak betetzen ez zituztelako (23.irudia), 8 artikulu oso lortuz. Hauetatik, bi artikuluk rs231775 polimorfismoa eta OS arriskua aztertzen zuten.



23. irudia Hautatutako artikuluaren fluxu-diagrama.

1.4.2 rs231775 SNPAREN META-ANALISIA

rs231775 SNParen meta-analisan Txinako bi populazio eta guk genotpatutako Espainiako populazioa erabili genituen. Genotipoen banaketa kontroletan HW oreka jarraitzen zuten ($p > 0,05$). Artikulu guztiek kalitate eskala gainditu zuten (>5 balioa).

Maiztasun alelikoen bidezko asoziazio-analisan rs231775 OS arriskuarekin asoziatuta zegoen meta-analisiko 3 populazioetan (24.taula).

24. taula. *CTLA4* genearen rs231775 SNParen maiztasun alelikoen bidezko asoziazio-analisia meta-analisiko artikuluetan.

Populazioa	N _{kontrolak}	N _{kasuak}	AM	F _{kontrolak}	F _{kasuak}	OR (%95KT)	P	Erref	Urtea
España	123	66	A	0,63	0,37	1,36 (0,87-2,02)	0,21		2015 (PE)
Txina	282	267	A	0,46	0,54	1,32 (1,03-1,69)	0,03	(56)	2011
Txina	216	205	A	0,47	0,53	1,41 (1,07-1,87)	0,02	(57)	2011

Laburdurak: AM, kontrolen maiztasun txikikoena duen aleloa; MAF, alelo txikienaren maiztasuna; OR, Odds Ratio; KT, Konfidantza-tartea; N, kopurua; Fr., maiztasun alelikoa; PE: Gure azterketa; Erref: Erreferentzia; * Esangarria.

rs231775 SNParen alelo txikienaren maiztasuna ezberdina zenez populazio asiatiakoan (populazio espainiarrarekin konparatuta), eta hori dela eta, maiztasun genotipikoen bidezko analisirako populazio asiatikoko alelo txikiena hartu genuen erreferentziatzat. Beraz, maiztasun genotipikoen bidezko MAn AA+AG vs GG eta AA vs GG+AG konparaketak egin genituen hiru populazioetan (25.taula). AA vs GG+AG konparaketak hiru populazioetan OS arriskuarekin asoziatuta topatu genuen non AA genotipoak OS arriskua areagotzen zuen (OR= 2,24, OR: 1,91 eta OR: 2,08) (25.taula).

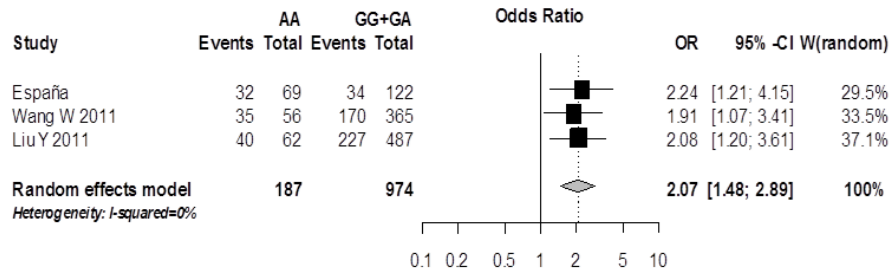
25. taula *CTLA4* genearen rs231775 polimorfismoaren eta OS arriskuaren maiztasun genotipikoen bidezko asoziazio analisiaren emaitzak meta-analisen artikuluetan.

Populazioa	AM	Genotipoa	N(%) kontrolak	N(%) kasuak	OR _{AA+AGvsGG} (%95KT)	P	OR _{AAvsGG+AG} (%95KT)	P	Erref	Urtea
España	A	AA	37 (29,6)	32 (48,5)	GG AA+AG 0,42 (0,12-1,42)	0,19	GG+AG AA 2,24 (1,21-4,15)	0,01		2015 (PE)
		AG	83 (66,4)	28 (42,4)						
		GG	5 (4,0)	6 (9,1)						
		Total	125 (100)	66 (100)						
Txina	A	AA	22 (7,8)	40 (15,0)	GG AA+AG 1,49 (0,99-2,22)	0,05	GG+AG AA 1,91 (1,07-3,41)	0,03	(56)	2011
		AG	140 (49,6)	128 (47,9)						
		GG	120 (42,6)	99 (37,1)						
		Total	282(100)	267 (100)						
Txina	A	AA	21 (9,7)	35 (17,1)	GG AA+AG 1,26 (0,89-1,77)	0,19	GG+AG AA 2,08 (1,20-3,61)	0,01	(57)	2011
		AG	108 (50)	106 (51,7)						
		GG	87 (40,3)	64 (31,2)						
		Total	216 (100)	205 (100)						

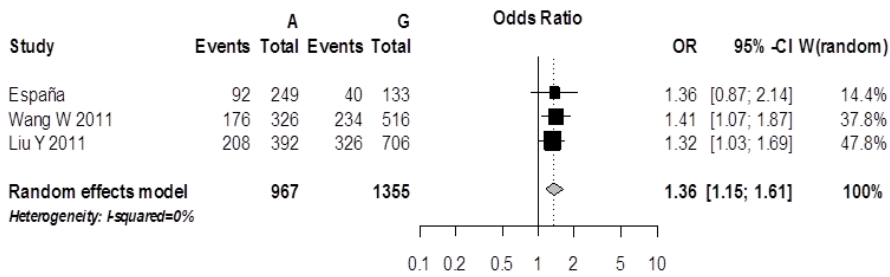
Laburdurak: AM, kontrolen maiztasun txikikoena duen aleloa; OR, Odds Ratio; KT, Konfidantza-tartea; kod, kodominantea; dom, dominantea; errez, errezesiboa; log, log-aditiboa, Eref, Erreferentzia, PE: Gure azterketa.

Maiztasun genotipikoen bidezko MAn, artikuluko guztiek antzeko pisua izan zuten (%30koa gutxi gora behera); hala ere, maiztasun alelikoen bidezko analisisian Liu eta kolaboratzaileak lanak, %47,8ko pisua zuen eta populazio espainiarrean %14,4. Ez zen heterogeneitate topatu artikuluen artean (24. irudia).

AA vs GG+GA



A vs G



24. irudia rs231775 polimorfismoaren MA.

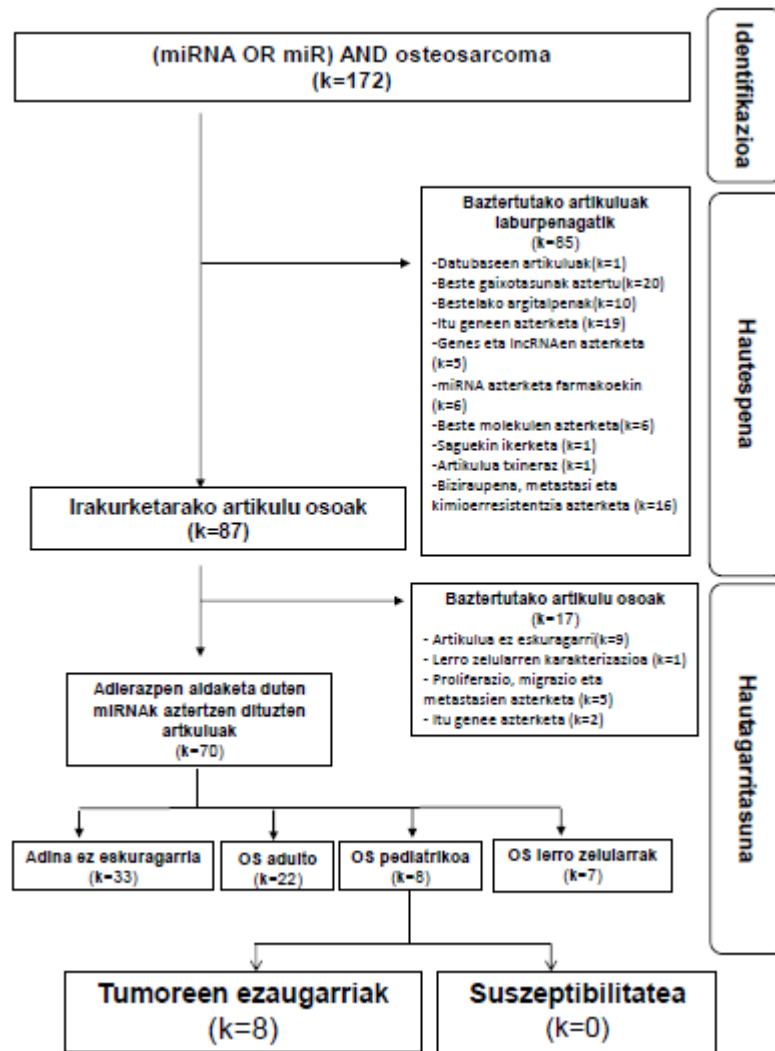
MAren emaitzak AA genotipoak OS arriskua areagotzen zuela OS (OR= 2,07, IC95%: 1,48-2,89). Era berean, A aleloak arriskua areagotzen zuen (OR= 1,36, IC95%: 1,15-1,61).

2. MIRNAEKIN ERLAZIONATUTAKO GENEEN SNPEN AZTERKETA

OS suszeptibilitatean inplikatur dauden miRNAk determinatzeko OSan adierazpena aldatuta daukaten miRNAk topatzeko bilaketa bibliografiko sakona egin genuen.

2.1 OSREN SUSZEPTIBILITATEAN ADIERAZPEN ALDAKORREKO MIRNAEN BILAKETA BIBLIOGRAFIKOA

Bilaketa bibliografikoan 172 argitalpen identifikatu genituen (25.irudia). Artikuluen laburpenak berrikusi ostean, 85 argitalpen baztertu genituen inklusio irizpideak ez zituztelako betetzen. Hortaz, 87 artikulua osorik irakurri genituen. Hauetatik, 17 artikulua baztertu genituen miRNA ituen bilatzen zituztelako, miRNAen papera tumorigenesian, pronotiko, metastasia, biziraupena edo tratamenduaren erantzuna aztertzen zutelako edo artikulua eskuratu ezin izan genuelako baztertu genituen. Horrez gain, zazpi lan baztertu genituen lerro zelularrekin ikertzeagatik; 33 pazienteen adina ez zehazteagatik eta 22 OS paziente nagusiak zirelako baztertu genituen. Azkenik, 8 artikuluk OS gazteen tumorigenesian miRNA adierazpen aldaketak aztertu zituen baina ez genuen topatu OS suszeptibilitatean eragiten zuten miRNA adierazpen aldaketa aztertzen zituen artikulurik.



25. irudia Bilaketa bibliografikoaren fluxu-diagrama.

OS suszeptibilitatearen arriskuaren adierazle ziren miRNAerik ez genduz topatu, miRNAekin erlacionatutako gene guztien aldakortasun genetikoaz aztertzea erabaki genuen, hau da, miRNA prozesamenduan diharduten geneak eta miRNA geneak.

2.2 MIRNAEN PROZESAMENDU GENEEN SNPEN AZTERKETA

miRNA prozesamendu geneen polimorfismoak haien funtzioan eragin dezakete eta ondorioz, OSren garapenean diharduten miRNA mailak aldatu. MiRNA prozesamendu genetako polimorfismoek OS suszeptibilitatearen arriskuan eragiten zuten ala ez zehazteko helburuarekin 72 polimorfismo aztertu genituen 21 miRNA prozesamendu genetan.

2.2.1 LAGINAK

miRNA prozesamendu geneen azterketarako 99 OS gaztek (<34 urte) eta 387 kontrolak parte hartu zuten. Kasu hauek Nafarroako Klinika Unibertsitateko Pediatriako departamentuko Onkologia sailean diagnostikatu ziren. Kontrol taldea Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) C.0001171 bildumaren parte eta jatorri europearra (minbizi historiarik bakoak) zuten (26. Taula).

26. taula miRNA prozesamendu geneen asoziazio-analisiko populazioaren adin eta sexu banaketa.

	Kontrolak	Kasuak
Partehartzaileak (n)	387	99
Adina* (bte, de)	51,2 ± 7,7	14,60 ± 5,23
Sexua* (n; %)		
Gizonezkoak	199 (51,4)	55 (55,6)
Emakumezkoak	187 (48,3)	44 (44,4)

Laburdurak: n, norbanako kopurua; de, desbiderapen estandarra; de, daturik ez; bte, batazbeste. * Partehartzaile batzuren adin eta sexu datuak falta ziren.

2.2.2 GENOTIPAZIO ARRAKASTA

Laginen %87,86k (427/486) eta SNPen %93,05 SNPs (67/72) genotipatu ziren modu arrakastatsuan. %20tik gorako genotipo galduak dituzten SNPak (n=59), amplifikatu ez duten SNPak eta klusterrak banatzeko intentsitate nahikoa izan ez duten SNPak (n=5) analisitik baztertu ziren. Horrez gain, genotipatutako 67 SNPetatik 10k ez zuten HW oreka bete kontrol taldean eta ondorioz, analisitik baztertu ziren. Guztira, 15 SNP baztertu ziren (4. taula osagarria) 57 SNP analizatuz.

2.2.3 ASOZIAZIO-ANALISIA

MiRNA prozesamendu geneen aldakortasun genetikoak OS arriskuan eragiten zuten aztertzeko bai maiztasun aleliko zein maiztasun genotipikoak 57 polimorfismo 21 genetan analizatu genituen. Hiru polimorfismo hiru prozesamendu genetan (*CNOT1*, *CNOT4* eta *SND1*) OS arriskuarekin asoziatuak zeuden ($p < 0,05$) (5. Taula osagarria).

rs11866002 SNPa asoziaziorik adierazgarriena izan zen. Eredu dominantean, CT+TT genotipoak OS suszeptibilitatean arriskuaren murrizpenarekin (OR= 0,44; 95% IC: 0,27-0,73; $p = 0,001$) asoziatu zen. Bonferroni zuzenketaren ostean ere adierazgarria mantendu zen ($p = 0,08$). rs3812265 SNPa *CNOT4* genean ($p=0,025$; eredu dominantean) eta rs3823994 SNPa *SND1* genean ($p=0,041$, eredu aditiboan) ere OS arriskuarekin asoziatuta zeuden (Bonferroni zuzenketaren aurretik)(27.taula).

27.taula MiRNA prozesamendu geneen polimorfismoen eta OS arriskuaren asoziazio analisiaren emaitzak maiztasun genotipikoen bidez.

Genea	SNP	Genotipoa	N (%) kontrolak	N (%) kasuak	OR (IC 95%) kod	P kod	OR(IC 95%) errez	P errez	OR(IC 95%) dom	P dom	OR(IC 95%) log	P log
<i>CNOT1</i>	rs11866002	CC	134 (38,7)	46 (59,0)	1,00	0,005	CC/CT 1,00 TT 0,68 0,28 1,66	0,373	CC 1,00 CT/TT 0,44 (0,27-0,73)	0,001*	0,55 (0,36-0,83)	0,003
		CT	174 (50,3)	26 (33,3)	0,44 (0,26- 0,74)							
		TT	38 (11,0)	6 (7,7)	0,46 (0,18-1,16)							
<i>CNOT4</i>	rs3812265	CC	212 (63,1)	39 (49,4)	1,00	0,059	CC/CT 1,00 TT 0,84 (0,24- 2,99)	0,790	CC 1,00 CT/TT 1,75 (1,07-2,87)	0,026	1,45 (0,97-2,18)	0,076
		CT	109 (32,4)	37 (46,8)	1,85 (1,11- 3,06)							
		TT	15 (4,5)	3 (3,8)	1,09 (0,30-3,93)							
<i>SND1</i>	rs3823994	AA	163 (46,8)	47 (59,5)	1,00	0,117	AA/AT 1,00 TT 0,61 (0,21-1,79)	0,341	AA 1,00 AT/TT 0,60 (0,37- 0,99)	0,042	0,66 (0,43-0,99)	0,041
		AT	157 (45,1)	28 (35,4)	0,62 (0,37-1,04)							
		TT	28 (8,0)	4 (5,1)	0,50 (0,17-1,48)							

Laburdurak: AM, kontrolen maiztasun txikikoena duen aleloa; OR, Odds Ratio; KT, Konfidantza-tartea; kod, kodominantea; dom, dominantea; errez, errezesiboa; log, log-aditiboa. *Adierazgarria Bonferroniren zuzenketaren ostean.

2.3 MIRNA GENEEN ALDAKORTASUN GENETIKOAREN AZTERKETA

miRNA geneetan dauden polimorfismoak haien funtzioan eragin dezakete eta ondorioz, OS suszeptibilitatean eragin dezaketen miRNA mailak aldatu daitezke. miRNA polimorfismoak OS arriskuan eragiten zuten ala ez zehazteko 213 polimorfismo aztertu genituen 206 miRNA geneetan.

2.3.1 LAGINA

miRNA geneen aldakortasun genetikoa aztertzeko 100 OS (<34 urte) pazienteek parte hartu zuten: 74 kasu Espainiako 3 ospitaletik eta 26 kasu Liublianako University Children's Ospitaletan diagnostikatuak. Kontrol taldea 256 indibiduok osatzen zuten (n=160 eta n=96, hurrenez hurren). Kasu eta kontrolen ezaugarri demografikoak 28. Taula adierazi dira.

28. taula miRNA geneen asoziazio-analisiko populazioaren adin eta sexu banaketa.

	Totalak	Kontrolak	Kasuak
Partehartzaileak* (n)	356	256	100
Populazioa (n;%)			
Espainia	234	160 (68,37)	74 (31,62)
Eslovenia	122	96 (78,68)	26 (21,31)
Adina* (bte; ds)			
Espainia	-	69,01 (17,5)	14,5 (4,7)
Eslovenia	-	46,0 (9,3)	19,5 (8,6)
Sexua* (e/g)			
Espainia	111/120	81/79	30/41
Eslovenia	51/71	38/58	13/13

Laburdurak: n, norbanako kopurua; de, desbiderapen estandarra; e, emakumeak; g, gizonezkoak; de, daturik ez; bte, batzbestea.* Partehartzaile batzuren adin eta sexu datuak falta ziren (3 kasu Espainiako populazioan).

2.3.2 GENOTIPAZIO ARRAKASTA

miRNA geneen azterketan 356 DNA laginetatik 353 modu arrakastatsuan genotipatu ziren (99,16%). %20tik gorako genotipo galduak zituzten laginak ezabatu ziren. Guztira, 213 SNP hautatu ziren 206 pre-miRNAtan (9 eta 10 taula osagarriak). Hautatutako 213 SNPetatik 151 SNP modu arrakastatsuan genotipatu ziren (%70,9). Anplifikatu ez zuten SNPak PCRren

anplifikazio eza eta *clusterrak* banatzeko intentsitate nahikoa ez izanagatik baztertu ziren. Era berean, populazio espainiarrean 7 SNPeK eta populazio esloveniarrean 3 SNPeK ez zeuden HW orekan, hortaz, ez ziren ondorengo analisietarako kontuan hartu. Genotipazio arrakastaren zehaztasunak 6.taula osagarrian adierazi dira.

2.3.3 ESPAINIAKO POPULAZIOAREN ASOZIAZIO-ANALISIA

Maiztasun genotipikoen bidezko asoziazio-analisan 14 polimorfismok 14 miRNA OS arriskuarekin asoziatuak zeuden ($p < 0,05$). Azpimarragarria da, 4 SNP 14q32 gene kromosomikoan kokatuta zeuden, 3 SNP 19. Kromosoman, 2 SNP 4q24-25 eta 2 SNP 5q gene kromosomikoan. Adierazgarriak ziren polimorfismo guztiak pre-miRNA kokatuta zeuden, rs35770269 mir-449c miRNAren *seed* gunean kokatuta zeuden. FDR bidezko zuzenketaren ostean ez zen SNP adierazgarririk azaldu (29.taula, 7. Taula osagarria).

29. taula MiRNA geneen polimorfismoen eta OS arriskuaren asoziazio analisiaren emaitzak maiztasun genotipikoen bidez Espainiako populazioan.

miRNA	SNP	Kokapena	GK	Genotipoa	N(%) kontrolak	N(%) kasuak	OR (%95KT)	P	
1	mir-300	rs12894467	PM	14q32	CC	74 (46,2)	19 (27,5)	2,01 (1,32-3,06)	0,00099 (log)
					CT	71 (44,4)	34 (49,3)		
					TT	15 (9,4)	16 (23,2)		
					Totalak	160 (100)	69 (100)		
2	mir-2278	rs356125	PM	9q22	GG	140 (87,5)	68 (98,6)	1 0,1 (0,01-0,78) 0,00 (0,00)	0,00224 (cod)
					AG	20 (12,5)	1 (1,4)		
					AA	0 (0)	0 (0)		
					Totalak	160 (100)	69 (100)		
3	mir-576	rs77639117	PM	4q25	AA	156 (97,5)	60 (87,0)	1 5,85 (1,74-19,71) 0,00 (0,00)	0,00271 (cod)
					AT	4 (2,5)	9 (13,0)		
					TT	0 (0)	0 (0)		
					Totalak	160 (100)	69 (100)		
4	mir-3188	rs7247237	PM	19p13	CC	72 (45,3)	23 (34,3)	1 3,59 (1,49-8,66)	0,00449 (rec)
					CT	77 (48,4)	31 (46,3)		
					TT	10 (6,3)	13 (19,4)		
					Totalak	159 (100)	67 (100)		
5	mir-492	rs2289030	PM	12q22	CC	130 (81,2)	60 (87,0)	1 0,00	0,02652 (rec)
					CG	30 (18,8)	6 (8,7)		
					GG	0 (0,0)	3 (4,3)		
					Totalak	160 (100)	69 (100)		
6	mir-2053	rs10505168	PM	8q23,3	AA	78 (49,1)	25 (36,2)	1 2,02 (1,11-3,65) 0,39 (0,08-1,81)	0,00869 (cod)
					AG	65 (40,9)	42 (60,9)		
					GG	16 (10,1)	2 (2,9)		
					Totalak	159 (100)	69 (100)		
7	mir-4467	rs60871950	M	7q22,1	GG	35 (22,0)	27 (39,1)	1 0,44 (0,24-0,81)	0,00880 (dom)
					AG	83 (52,2)	23 (33,3)		
					AA	41 (25,8)	19 (27,5)		
					Totalak	159 (100)	69 (100)		
8	mir-412	rs61992671	M/PM	14q32	GG	57 (35,6)	13 (20,0)	1 2,21 (1,11-4,41)	0,0185 (dom)
					AG	66 (41,2)	35 (53,8)		
					AA	37 (23,1)	17 (26,2)		
					Totalak	160 (100)	65 (100)		
9	mir-5196	rs10406069	PM	19q13	GG	110 (69,6)	43 (62,3)	1 1,71 (0,93-3,13) 0,00 (0,00)	0,0207 (codom)
					AG	39 (24,7)	26 (37,7)		
					AA	9 (5,7)	0 (0,0)		
					Totalak	158 (100)	69 (100)		
10	mir-656	rs58834075	PM	14q32	CC	157 (98,1)	63 (91,3)	1 4,98 (1,21-20,55)	0,02102 (codom)
					CT	3 (1,9)	6 (8,7)		
					TT	0 (0)	0 (0)		
					Totalak	160 (100)	69 (100)		
11	mir-4309	rs12879262	PM	14q32	GG	111 (69,8)	39 (56,5)	1 1,99 (1,10-3,59) 0,00 (0,00)	0,0223 (codom)
					CG	43 (27,0)	30 (43,5)		
					CC	5 (3,1)	0 (0,0)		
					Totalak	159 (100)	69 (100)		
12	mir-378h	rs702742	PM	5q33	AA	117 (73,1)	58 (86,6)	1 0,42 (0,19-0,93)	0,0224 (dom)
					AG	41 (25,6)	8 (11,9)		
					GG	2 (1,2)	1 (1,5)		
					Totalak	160 (100)	67 (100)		
13	mir-4745	rs10422347	M/PM	19p13	CC	138 (87,3)	51 (75,0)	1 2,30 (1,12-4,73)	0,0255 (dom)
					CT	19 (12,0)	17 (25,0)		
					TT	1 (0,6)	0 (0,0)		
					Totalak	158 (100)	68 (100)		
14	mir-449c	rs35770269	PM/seed	5q11	AA	61 (38,4)	35 (50,7)	0,64 (0,42-0,98)	0,0382 (log)
					AT	71 (44,7)	28 (40,6)		
					TT	27 (17,0)	6 (8,7)		
					Totalak	159 (100)	69 (100)		

Laburdurak: AM, kontrolen maiztasun txikikoena duen aleloa; OR, Odds Ratio; KT, Konfidantza-tartea; kod, kodominantea; dom, dominantea; errez, errezesiboa; log, log-aditiboa; PM: miRNA pre-heldua, M:miRNA heldua; GK: Gune kromosomikoa
*Adierazgarria Bonferroniaren zuzenketaren ostean.

Bestalde, maiztasun alelikoen bidezko asoziazio-analisan 10 polimorfismok 10 miRNA OS arriskuarekin asoziatuak zeuden ($p < 0,05$) (30. Taula). Hiru SNP hiru miRNA (mir-4752, mir-4268 eta mir-1283-2) berri OSren arriskuarekin asoziatuak topatu genituen maiztasun genotipikoekin konparatuz. mir-449c miRNA kokatuta dagoen SNPa *seed* gunean kokatuta zegoela datu interesgarria izan zen.

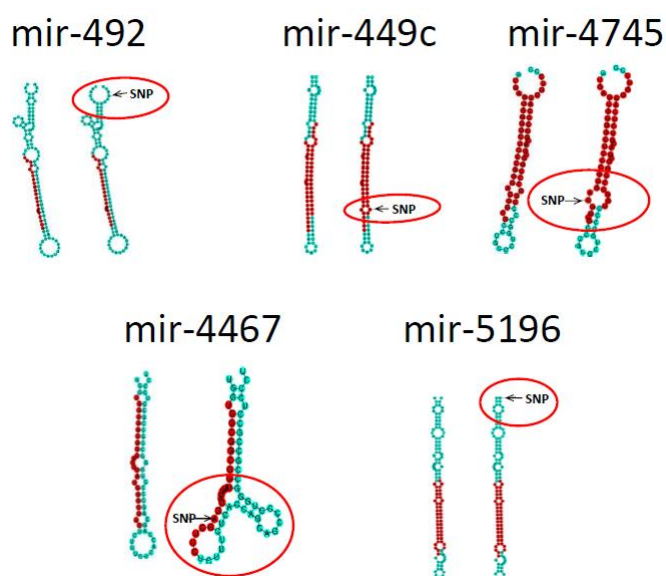
30. taula MiRNA geneen polimorfismoen eta OS arriskuaren asoziazio analisiaren emaitzak maiztasun alelikoen bidez Espainiako populazioan.

	Genea	SNP	Kokapena	GK	Aleloa	Maiztasuna kontrolatan	Maiztasuna kasuetan	OR (%95KT)	P
1	mir-300	rs12894467	PM	14q32	T	0,316	0,493	2,11 (1,42-3,15)	0,0002
2	mir-576	rs77639117	PM	4q25	T	0,012	0,061	5,16 (1,55-16,89)	0,0031
3	mir-3188	rs7247237	PM	19p13	T	0,305	0,438	1,77 (1,18-2,67)	0,0056
4	mir-2278	rs356125	PM	9q22	G	0,938	0,993	9,8 (1,30-73,73)	0,0068
5	mir-656	rs58834075	PM	14q32	T	0,009	0,047	5,24 (1,34-20,58)	0,0083
6	mir-4752	rs4112253	PM	19q13	C	0,619	0,730	1,66 (1,09-2,55)	0,0189
7	mir-4745	rs10422347	M/PM	19p13	T	0,066	0,130	2,10 (1,09-4,04)	0,0236
8	mir-4268	rs4674470	PM	2q35	T	0,865	0,783	1,77 (1,03-3,05)	0,0364
9	mir-1283-2	rs71363366	PM	19q13	G	0,019	0,054	2,99 (1,02-8,78)	0,0371
10	mir-449c	rs35770269	PM/seed	5q11	A	0,607	0,703	1,53 (1,01-2,33)	0,0453

Laburdurak: AM, kontrolen maiztasun txikikoena duen aleloa; OR, Odds Ratio; KT, Konfidantza-tartea; PM: miRNA pre-heldua, M:miRNA heldua; GK: Gune kromosomikoa *Adierazgarria Bonferroniren zuzenketaren ostean.

2.3.4 ESPAINIAKO POPULAZIOAREN MIRNA *IN SILICO* ANALISIA

Mir-SNPak miRNA egitura sekundarioan aldaketarik sortzen zuten jakiteko egitura honetan gertatzen den miRNA loturen arteko energia askea behatu genuen tresna bioinformatikoen bitartez. Populazio espainiarrean rs2289030 SNPa mir-492 miRNAn, rs35770269 SNPa mir-449c miRNAn, rs10422347 SNPa mir-4745 miRNAn, rs60871950 SNPa mir-4467 miRNAn eta rs10406069 SNPa mir-5196 miRNAn miRNAen egitura sekundarioan aldaketak sortzen zituzten (27. Irudia).



27. irudia miRNAren bigarren mailako egitura aldatzen zuten OSren arriskuarekin asoziatuta zeuden mir-SNPak, miRNASNP datubasearen iragarpena.

2.3.5 ESLOVENIAKO POPULAZIOAREN ASOZIAZIO-ANALISIA

Maiztasun genotipikoen bidezko asoziazio-analisan 9 polimorfismok 8 miRNA OS arriskuarekin asoziatuak zeuden ($p < 0,05$) Esloveniako populazioan. Azpimarragarria da, 3 SNP miRNAren *seed* gunean (mir-3620, mir-4707 y mir-499a), bi SNP (rs35613341 y rs56292801) mir-5189 miRNA kokatuta zeuden eta 2 SNP (rs6726779 y rs243080) 2p16 gene kromosomikoan kokatuta zeuden. rs35613341 SNPa mir-5189 miRNA Bonferroniren zuzenketaren ostean adierazgarria izan zen (31. Taula, 8 taula osagarria).

31.taula MiRNA geneen polimorfismoen eta OS arriskuaren asoziazio analisiaren emaitzak maiztasun genotipikoen bidez Esloveniako populazioan.

miRNA	SNP	Kokapena	GK	Genotipoa	N(%) kontrolak	N(%) kasuak	OR (%95KT)	P	
1	mir-5189	rs35613341	PM	16q24	CC	49 (51,0)	16 (69,6)	1 0,07 (0,01-0,59) 3,06 (0,86-10,85)	0,00011* (codom)
					CG	41 (42,7)	1 (4,3)		
					GG	6 (6,2)	6 (26,1)		
					Totalak	96 (100)	23(100)		
2	mir-4268	rs4674470	PM	2q35	TT	50 (52,1)	17 (85,0)	1 0,07 (0,01-0,58) 0,98 (0,18-5,33)	0,00208 (codom)
					CT	40 (41,7)	1 (5,0)		
					CC	6 (6,2)	2 (10,0)		
					Totalak	96 (100)	20 (100)		
3	mir-3620	rs2070960	PM/ <i>seed</i>	1q42	CC	75 (78,9)	21 (87,5)	1 0,18 (0,02-1,41) 0,00	0,00783 (codom)
					CT	20 (21,1)	1 (4,2)		
					TT	0 (0,0)	2 (8,3)		
					Totalak	95 (100)	24 (100)		
4	mir-5189	rs56292801	PM	16q24	GG	51 (53,1)	18 (81,8)	1 0,25 (0,08-0,80)	0,01017 (dom)
					AG	41 (42,7)	3 (13,6)		
					AA	4 (4,2)	1 (4,5)		
					Totalak	96 (100)	22 (100)		
5	mir-4707	rs2273626	PM/ <i>seed</i>	14q11	AA	31 (32,3)	2 (8,7)	1 5,01 (1,10-22,72)	0,0132 (dom)
					AC	45 (46,9)	15 (65,2)		
					CC	20 (20,8)	6 (26,1)		
					Totalak	96 (100)	23(100)		
6	mir-4431	rs6726779	PM	2p16	TT	34 (35,8)	12 (63,2)	1 0,22 (0,07-0,75) 0,85 (0,20-3,62)	0,0272 (codom)
					CT	51 (53,7)	4 (21,1)		
					CC	10 (10,5)	3 (15,8)		
					Totalak	95 (100)	19 (100)		
7	mir-5682	rs9877402	PM	8q22	AA	88 (93,6)	17 (85,0)	1 0,00	0,0296 (rec)
					AG	6 (6,4)	1 (5,0)		
					GG	0 (0,0)	2 (10,0)		
					Totalak	94 (100)	20 (100)		
8	mir-4432	rs243080	PM	2p16	CC	30 (31,6)	12 (57,1)	1 0,35 (0,13-0,91)	0,0303 (dom)
					CT	49 (51,6)	5 (23,8)		
					TT	16 (16,8)	4 (19,0)		
					Totalak	95 (100)	21 (100)		
9	mir-499a	rs3746444	PM/ <i>seed</i>	20q11	TT	64 (66,7)	18 (75,0)	1 6,71 (1,06-42,73)	0,0444 (rec)
					CT	30 (31,2)	3 (12,5)		
					CC	2 (2,1)	3 (12,5)		
					Totalak	96 (100)	24 (100)		

Laburdurak: AM, kontrolen maiztasun txikikoena duen aleloa; OR, Odds Ratio; KT, Konfidantza-tartea; kod, kodominantea; dom, dominantea; errez, errezesiboa; log, log-aditiboa; PM: miRNA pre-heldua, M: miRNA heldua; GK: Gune kromosomikoa
*Adierazgarria Bonferroniren zuzenketaren ostean.

Bestalde, maiztasun alelikoen bidezko asoziazio-analisan 3 polimorfismok 3 miRNA OS arriskuarekin asoziatuak zeuden ($p < 0,05$) (32. Taula). Emaitza interesgarrien artean,

rs2273626 SNPa mir-4707 miRNaren seed gunean kokatuta dago. Emaitza hauek maiztasun genotipikoekin alderatuz, SNP berria topatu genuen OSren arriskuarekin asoziatuta: rs2042253 SNPa mir-5197 miRNAn.

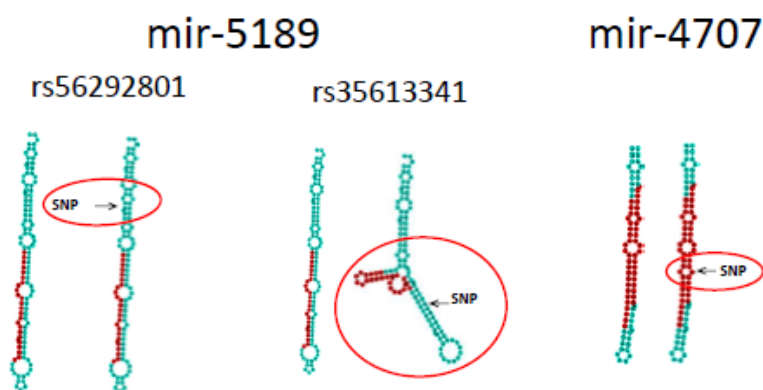
32.taula MiRNA geneen polimorfismoen eta OS arriskuaren asoziazio analisiaren emaitzak maiztasun alelikoen bidez Esloveniako populazioan.

	Genea	SNP	Kokapena	GK	Aleloa	Maiztasuna kontroletan	Maiztasuna kasuetan	OR (%95KT)	P
2	mir-4707	rs2273626	PM/seed	14q11	C	0,443	0,667	2,52 (1,12-5,66)	0,0223
3	mir-5197	rs2042253	PM	5q31	A	0,753	0,933	4,60 (1,06-20,05)	0,0271
5	mir-5189	rs56292801	PM	16q24	G	0,745	0,929	4,45 (1,02-19,46)	0,0313

Laburdurak: AM, kontrolen maiztasun txikikoena duen aleloa; OR, Odds Ratio; KT, Konfidantza-tartea; PM: miRNA pre-heldua, M: miRNA heldua; GK: Gune kromosomikoa *Adierazgarria Bonferroniren zuzenketaren ostean.

2.3.6 ESLOVENIAKO POPULAZIOAREN MIRNA *IN SILICO* ANALISIA

Populazio esloveniarrean rs56292801 eta rs35613342 SNPak mir-5189 miRNAn eta rs2273626 mir-4707 miRNAn miRNAen egitura sekundarioan aldaketak sortzen zituzten (28. Irudia).



28. irudia miRNaren bigarren mailako egitura aldatzen zuten OSren arriskuarekin asoziatuta zeuden mir-SNPak, miRNASNP datubasearen iragarpena.

2.3.7 ESPAINIAKO ETA ESLOVENIAKO POPULAZIOEN MIRNA *IN SILICO* ANALISIA

Maiztasun genotipikoen bidezko asoziazio-analisan 12 polimorfismok 12 miRNA OS arriskuarekin asoziatuak zeuden ($p < 0,05$) Espainiako eta Esloveniako populazioetan. Emaitza hauek populazio bakoitzekin konparatuz gero, 12 SNPtatik 9 SNPek jadanik OS arriskuarekin asoziazioa erakutsi zuten. FDR bidezko zuzenketaren ostean ez zen SNP adierazgarririk azaldu (32. Taula, 9. taula osagarria).

32. taula MiRNA geneen polimorfismoen eta OS arriskuaren asoziazio analisiaren emaitzak maiztasun genotipikoen bidez populazio guztietan.

	miRNA	SNP	Populazioak batera				Populazio espainiarra			Populazio esloveniarrak		
			Genotipoa	Kontrolak	Kasuak	P	Kontrolak	Kasuak	P	Kontrolak	Kasuak	P
1	mir-576	rs77639117	AA	249 (97,3)	81 (88,0)	0,002	156 (97,5)	60 (87,0)	0,003	93 (96,9)	21 (91,3)	0,1
			AT	7 (2,7)	10 (10,9)		4 (2,5)	9 (13,0)		3 (3,1)	1 (4,3)	
			TT	0 (0,0)	1 (1,1)		0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	1 (4,3)	
			Totalak	256 (100)	92 (100)		160 (100)	69 (100)		96 (100)	24 (100)	
2	mir-5682	rs9877402	AA	233 (92,5)	32 (84,2)	0,002	145 (91,8)	15 (83,3)	0,07	88 (93,6)	17 (85,0)	0,03
			AG	19 (7,5)	3 (7,9)		13 (8,2)	2 (11,1)		6 (6,4)	1 (5,0)	
			GG	0 (0,0)	3 (7,9)		0 (0,0)	1 (5,6)		0 (0,0)	2 (10,0)	
			Totalak	252 (100)	38 (100)		158 (100)	18 (100)		94 (100)	20 (100)	
3	mir-4707	rs2273626	CC	45 (25,4)	30 (33,3)	0,004	25 (30,9)	24 (35,8)	0,1	20 (20,8)	6 (26,1)	0,01
			AC	79 (44,6)	47 (52,2)		34 (42,0)	32 (47,8)		45 (46,9)	15 (65,2)	
			AA	53 (29,9)	13 (14,4)		22 (27,2)	11 (16,4)		31 (32,3)	2 (8,7)	
			Totalak	177 (100)	90 (100)		81 (100)	67 (100)		96 (100)	23 (100)	
4	mir-4268	rs4674470	TT	151 (59,2)	67 (75,3)	0,006	101 (63,5)	50 (72,5)	0,06	50 (52,1)	17 (85,0)	0,002
			CT	87 (34,1)	19 (21,3)		47 (29,6)	18 (26,1)		40 (41,7)	1 (5,0)	
			CC	17 (6,7)	3 (3,4)		11 (6,9)	1 (1,4)		6 (6,2)	2 (10,0)	
			Totalak	255 (100)	89 (100)		159 (100)	69 (100)		96 (100)	20 (100)	
5	mir-300	rs12894467	CC	99 (38,7)	26 (28,0)	0,01	74 (46,2)	19 (27,5)	0,001	25 (26,0)	7 (29,2)	0,5
			CT	124 (48,4)	45 (48,4)		71 (44,4)	34 (49,3)		53 (55,2)	11 (45,8)	
			TT	33 (12,9)	22 (23,7)		15 (9,4)	16 (23,2)		18 (18,8)	6 (25,0)	
			Totalak	256 (100)	93 (100)		160 (100)	69 (100)		96 (100)	24 (100)	
6	mir-4745	rs10422347	CC	218 (85,8)	68 (74,7)	0,02	138 (87,3)	51 (75,0)	0,03	80 (83,3)	17 (73,9)	0,3
			CT	34 (13,4)	23 (25,3)		19 (12,0)	17 (25,0)		15 (15,6)	6 (26,1)	
			TT	2 (0,8)	0 (0,0)		1 (0,6)	0 (0,0)		1 (1,0)	0 (0,0)	
			Totalak	254 (100)	91 (100)		158 (100)	68 (100)		96 (100)	23 (100)	
10	mir-3620	rs2070960	CC	216 (85,0)	74 (82,2)	0,02	141 (88,7)	53 (80,3)	0,09	75 (78,9)	21 (87,5)	0,008
			CT	38 (15,0)	13 (14,4)		18 (11,3)	12 (18,2)		20 (21,1)	1 (4,2)	
			TT	0 (0,0)	3 (3,3)		0 (0,0)	1 (1,5)		0 (0,0)	2 (8,3)	
			Totalak	254 (100)	90 (100)		159 (100)	66 (100)		95 (100)	24 (100)	
7	mir-1255a	rs28664200	TT	137 (54,6)	13 (39,4)	0,03	86 (55,5)	2 (15,4)	0,001	51 (53,1)	11 (55,0)	0,4
			CT	102 (40,6)	15 (45,5)		62 (40,0)	8 (61,5)		40 (41,7)	7 (35,0)	
			CC	12 (4,8)	5 (15,2)		7 (4,5)	3 (23,1)		5 (5,2)	2 (10,0)	
			Totalak	251 (100)	33 (100)		155 (100)	13 (100)		96 (100)	20 (100)	
8	mir-3188	rs7247237	CC	115 (45,3)	37 (40,2)	0,03	72 (45,3)	23 (34,3)	0,004	43 (45,3)	14 (56,0)	0,3
			CT	121 (47,6)	41 (44,6)		77 (48,4)	31 (46,3)		44 (46,3)	10 (40,0)	
			TT	18 (7,1)	14 (15,2)		10 (8,3)	13 (19,4)		8 (8,4)	1 (4,0)	
			Totalak	254 (100)	92 (100)		159 (100)	67 (100)		95 (100)	25 (100)	
9	mir-146a	rs2910164	GG	144 (56,2)	64 (68,8)	0,03	84 (52,5)	46 (66,7)	0,05*	60 (62,5)	18 (75,0)	0,2
			CG	96 (37,5)	23 (24,7)		66 (41,2)	18 (26,1)		30 (31,2)	5 (20,8)	
			CC	16 (6,2)	6 (6,5)		10 (6,2)	5 (7,2)		6 (6,2)	1 (4,2)	
			Totalak	256 (100)	93 (100)		160 (100)	69 (100)		96 (100)	24 (100)	
11	mir-4752	rs4112253	CC	103 (40,2)	46 (52,3)	0,03	60 (37,5)	34 (49,3)	0,05	43 (44,8)	12 (63,2)	0,1
			CG	119 (46,5)	35 (39,8)		78 (48,8)	30 (43,5)		41 (42,7)	5 (26,3)	
			GG	34 (13,3)	7 (8,0)		22 (13,8)	5 (7,2)		12 (12,5)	2 (10,5)	
			Totalak	256 (100)	88 (100)		160 (100)	69 (100)		96 (100)	19 (100)	
12	mir-6128	rs67042258	GG	143 (56,1)	59 (65,6)	0,04	89 (56)	47 (69,1)	0,06	54 (56,2)	12 (54,5)	0,1
			AG	97 (38,0)	22 (24,4)		62 (39)	16 (23,5)		35 (36,5)	6 (27,3)	
			AA	15 (5,9)	9 (10,0)		8 (5)	5 (7,4)		7 (7,3)	4 (18,2)	
			Totalak	255 (100)	90 (100)		159 (100)	68 (100)		96 (100)	22 (100)	

Hiru analisietan (populazio espainiarrean, esloveniarran eta batera) izandako emaitzak batera kontuan hartuz gero, 26 SNP 25 miRNAtan estatistikoki adierazgarri izan ziren: 14 SNP populazio espainiarrean, 9 SNP populazio esloveniarran eta 3 SNP bi populazioak bateratzerakoan (mir-146a, mir-4752 eta mir-6128). Kasu honetan, SNPak ez dira adierazgarriak populazio bakoitzean modu indibidualean baina arrisku genotipoek tendentzia bera erakutsi zuten (33.taula).

33. taula Maiztasun genotipikoen bidezko asoziazio-analisen emaitzen laburpena 3 populazioetan (jarraipena).

miRNA	SNP	Genotipoa	Populazioak batera			Populazio espainiarra			Populazio esloveniarrak				
			Kontrolak (N=256)	Kasuak (N=100)	P _{totalak}	Kontrolak (N=160)	Kasuak (N=74)	P _{espainiarrak}	Kontrolak (N=96)	Kasuak (N=26)	P _{esloveniarrak}		
1	mir-300	rs12894467 (PM)	CC	99 (38,7)	26 (28,0)	0,0103 TT 1,57(1,11-2,22)(log)	74 (46,2)	19 (27,5)	0,0010 TT 2,01 (1,32-3,06)(log)	25 (26,0)	7 (29,2)	0,5025	
			CT	124 (48,4)	45 (48,4)		71 (44,4)	34 (49,3)		53 (55,2)	11 (45,8)		
			TT	33 (12,9)	22 (23,7)		15 (9,4)	16 (23,2)		18 (18,8)	6 (25,0)		24 (100)
			Totalak	256 (100)	93 (100)		160 (100)	69 (100)		96 (100)	24 (100)		
2	mir-2278	rs356125 (PM)	GG	225 (87,9)	90 (94,7)	0,0460 AG/AA 0,40 (0,15-1,07)(dom)	140 (87,5)	68 (98,6)	0,0022 AG 0,1 (0,01-0,78)(cod)	85 (88,5)	22 (84,6)	0,6043	
			AG	30 (11,7)	5 (5,3)		20 (12,5)	1 (1,4)		10 (10,4)	4 (15,4)		
			AA	1 (0,4)	0 (0,0)		0 (0,0)	0 (0,0)		1 (1,0)	0 (0,0)		0 (0,0)
			Totalak	256 (100)	95 (100)		160 (100)	69 (100)		96 (100)	26 (100)		
3	mir-576	rs77639117 (PM)	AA	249 (97,3)	81 (88,0)	0,0015 AT/TT 4,83 (1,81-12,87)(rec)	156 (97,5)	60 (87,0)	0,0027 AT 5,85 (1,74-19,71)(cod)	93 (96,9)	21 (91,3)	0,1282	
			AT	7 (2,7)	10 (10,9)		4 (2,5)	9 (13,0)		3 (3,1)	1 (4,3)		
			TT	0 (0,0)	1 (1,1)		0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	1 (4,3)		23 (100)
			Totalak	256 (100)	92 (100)		160 (100)	69 (100)		96 (100)	23 (100)		
4	mir-3188	rs7247237 (PM)	CC	115 (45,3)	37 (40,2)	0,0275 TT 2,35 (1,12-4,95)(rec)	72 (45,3)	23 (34,3)	0,0045 TT 3,59 (1,49-8,66)(rec)	43 (45,3)	14 (56,0)	0,2726	
			CT	121 (47,6)	41 (44,6)		77 (48,4)	31 (46,3)		44 (46,3)	10 (40,0)		
			TT	18 (7,1)	14 (15,2)		10 (6,3)	13 (19,4)		8 (8,4)	1 (4,0)		25 (100)
			Totalak	254 (100)	92 (100)		159 (100)	67 (100)		95 (100)	25 (100)		
5	mir-492	rs2289030 (PM)	CC	211 (82,4)	79 (85,9)	0,0415 GG 8,60 (0,88-83,70)(rec)	130 (81,2)	60 (87,0)	0,0265 GG 0 (rec)	81 (84,4)	19 (82,6)	0,7989	
			CG	44 (17,2)	10 (10,9)		30 (18,8)	6 (8,7)		14 (14,6)	4 (17,4)		
			GG	1 (0,4)	3 (3,3)		0 (0,0)	3 (4,3)		1 (1,0)	0 (0,0)		0 (0,0)
			Totalak	256 (100)	92 (100)		160 (100)	69 (100)		96 (100)	23 (100)		
6	mir-2053	rs10505168 (PM)	AA	123 (48,2)	36 (40,4)	0,1128	78 (49,1)	25 (36,2)	0,0087 AG 2,02 (1,11-3,65) GG 0 (cod)	45 (46,9)	11 (55,0)	0,4723	
			AG	107 (42,0)	48 (53,9)		65 (40,9)	42 (60,9)		42 (43,8)	6 (30,0)		
			GG	25 (9,8)	5 (5,6)		16 (10,1)	2 (2,9)		9 (9,4)	3 (15,0)		20 (100)
			Totalak	255 (100)	89 (100)		159 (100)	69 (100)		96 (100)	20 (100)		
7	mir-4467	rs60871950 (M)	GG	78 (30,6)	36 (39,1)	0,1043	35 (22,0)	27 (39,1)	0,0088 AG/AA 0,44 (0,24-0,81)(dom)	43 (44,8)	9 (39,1)	0,4899	
			AG	121 (47,5)	32 (34,8)		83 (52,2)	23 (33,3)		38 (39,6)	9 (39,1)		
			AA	56 (22,0)	24 (26,1)		41 (25,8)	19 (27,5)		15 (15,6)	5 (21,7)		23 (100)
			Totalak	255 (100)	92 (100)		159 (100)	69 (100)		96 (100)	23 (100)		
8	mir-412	rs61992671 (M/PM)	GG	76 (29,7)	18 (20,7)	0,0973	57 (35,6)	13 (20,0)	0,0185 AG/AA 2,21 (1,11-4,41)(dom)	19 (19,8)	5 (22,7)	0,7419	
			AG	119 (46,5)	47 (54,0)		66 (41,2)	35 (53,8)		53 (55,2)	12 (54,5)		
			AA	61 (23,8)	22 (25,3)		37 (23,1)	17 (26,2)		24 (25,0)	5 (22,7)		22 (100)
			Totalak	256 (100)	87 (100)		160 (100)	65 (100)		96 (100)	22 (100)		
9	mir-5196	rs10406069 (PM)	GG	171 (67,3)	57 (62,6)	0,1075	110 (69,6)	43 (62,3)	0,0207 AG 1,71 (0,93-3,13) AA 0 (cod)	61 (63,5)	14 (63,6)	0,5394	
			AG	72 (28,3)	33 (36,3)		39 (24,7)	26 (37,7)		33 (34,4)	7 (31,8)		
			AA	11 (4,3)	1 (1,1)		9 (5,7)	0 (0,0)		2 (2,1)	1 (4,5)		22 (100)
			Totalak	254 (100)	91 (100)		158 (100)	69 (100)		96 (100)	22 (100)		
10	mir-656	rs58834075 (PM)	CC	245 (95,7)	89 (93,7)	0,4457	157 (98,1)	63 (91,3)	0,02102 CT 4,98 (1,21-20,55) TT 0 (cod)	88 (91,7)	26 (100,0)	0,2002	
			CT	11 (4,3)	6 (6,3)		3 (1,9)	6 (8,7)		8 (8,3)	0 (0,0)		
			TT	0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	0 (0,0)		26 (100)
			Totalak	256 (100)	95 (100)		160 (100)	69 (100)		96 (100)	26 (100)		
11	mir-4309	rs12879262 (PM)	GG	188 (73,7)	55 (60,4)	0,0098 CG 2,02 (1,21-3,36) CC 0 (cod)	111 (69,8)	39 (56,5)	0,0223 CG 1,99 (1,10-3,59) CC 0 (cod)	77 (80,2)	16 (72,7)	0,4494	
			CG	61 (23,9)	36 (39,6)		43 (27,0)	30 (43,5)		18 (18,8)	6 (27,3)		
			CC	6 (2,4)	0 (0,0)		5 (3,1)	0 (0,0)		1 (1,0)	0 (0,0)		22 (100)
			Totalak	255 (100)	91 (100)		159 (100)	69 (100)		96 (100)	22 (100)		
12	mir-378h	rs702742 (PM)	AA	204 (79,7)	77 (84,6)	0,2951	117 (73,1)	58 (86,6)	0,0224 AG/GG 0,42 (0,19-0,93)(dom)	87 (90,6)	19 (79,2)	0,1421	
			AG	49 (19,1)	13 (14,3)		41 (25,6)	8 (11,9)		8 (8,3)	5 (20,8)		
			GG	3 (1,2)	1 (1,1)		2 (1,2)	1 (1,5)		1 (1,0)	0 (0,0)		24 (100)
			Totalak	256 (100)	91 (100)		160 (100)	67 (100)		96 (100)	24 (100)		
13	mir-4745	rs10422347 (M/PM)	CC	218 (85,8)	68 (74,7)	0,0194 CT/TT 2,05 (1,14-3,69)(dom)	138 (87,3)	51 (75,0)	0,0255 CT/TT 2,30 (1,12-4,73)(dom)	80 (83,3)	17 (73,9)	0,3122	
			CT	34 (13,4)	23 (25,3)		19 (12,0)	17 (25,0)		15 (15,6)	6 (26,1)		
			TT	2 (0,8)	0 (0,0)		1 (0,6)	0 (0,0)		1 (1,0)	0 (0,0)		23 (100)
			Totalak	254 (100)	91 (100)		158 (100)	68 (100)		96 (100)	23 (100)		
14	mir-449c	rs35770269 (PM/seed)	AA	103 (40,4)	42 (46,7)	0,3387	61 (38,4)	35 (50,7)	0,0382 TT 0,64 (0,42-0,98)(log)	42 (43,8)	7 (33,3)	0,3761	
			AT	116 (45,5)	40 (44,4)		71 (44,7)	28 (40,6)		45 (46,9)	12 (57,1)		
			TT	36 (14,1)	8 (8,9)		27 (17,0)	6 (8,7)		9 (9,4)	2 (9,5)		21 (100)
			Totalak	255 (100)	90 (100)		159 (100)	69 (100)		96 (100)	21 (100)		

Laburdurak: AM, kontrolen maiztasun txikikoena duen aleoa; OR, Odds Ratio; KT, Konfidantza-tartea; kod, kodominantea; dom, dominantea; errez, errezesiboa; log, log-aditiboa; PM: miRNA pre-heldua, M: miRNA heldua; GK: Gune kromosomikoa *Adierazgarria Bonferroniren zuzenketaren ostean.

Tabla 33. Maiztasun genotipikoen bidezko asoziazio-analisen emaitzen laburpena 3 populazioetan.

						Populazioak batera			Populazio espainiarra						
miRNA	SNP	Genotipoa	Kontrolak (N=256)	Kasuak (N=100)	P _{totalak}	miRNA	SNP	Genotipoa	Kontrolak (N=256)	Kasuak (N=100)	P _{totalak}				
15	mir-5189	rs35613341 (PM)	CC	72 (45,0)	38 (56,7)	0,1069	49 (51,0)	16 (69,6)	0,0001*	121 (47,3)	54 (60)	0,0048			
			CG	57 (35,6)	17 (25,4)		41 (42,7)	1 (4,3)		CG 0,07 (0,01-0,59)	98 (38,3)		18 (20)	CG 0,41 (0,23-0,75)	
			GG	31 (19,4)	12 (17,9)		6 (6,2)	6 (26,1)		GG 3,06(0,86-0,85)(cod)	37 (14,5)		18 (20)	GG 1,09 (0,57-2,08)(cod)	
			Totalak	160 (100)	67 (100)		96 (100)	23 (100)			256 (100)		90 (100)		
			TT	101 (63,5)	50 (72,5)		50 (52,1)	17 (85,0)		0,0021	151 (59,2)		67 (75,3)	0,0057	
16	mir-4268	rs4674470 (PM)	CT	47 (29,6)	18 (26,1)	0,0582	40 (41,7)	1 (5,0)	0,0021	87 (34,1)	19 (21,3)	CT/CC 0,48 (0,28-0,82)(dom)			
			CC	11 (6,9)	1 (1,4)		6 (2,0)	2 (10,0)		CC 0,98 (0,18-5,33)(cod)	17 (6,7)		3 (3,4)		
			Totalak	159 (100)	69 (100)		96 (100)	20 (100)			255 (100)		89 (100)		
			CC	141 (88,7)	53 (80,3)		75 (78,9)	21 (87,5)		0,0078	216 (85,0)		74 (82,2)	0,0175	
			CT	18 (11,3)	12 (18,2)		20 (21,1)	1 (4,2)		CT 0,18 (0,02-1,41)	38 (15,0)		13 (14,4)	TT 0 (rec)	
17	mir-3620	rs2070960 (PM/seed)	TT	0 (0,0)	1 (1,5)	0,0929	0 (0,0)	2 (8,3)	0,0102	0 (0,0)	3 (3,3)	0,0717			
			Totalak	159 (100)	66 (100)		95 (100)	24 (100)			254 (100)		90 (100)		
			GG	43 (51,8)	39 (58,2)		51 (53,1)	18 (81,8)		0,0102	AG/AA 0,25 (0,08-0,80)(dom)		94 (52,5)	57 (64,0)	
			AG	26 (31,3)	20 (29,9)		41 (42,7)	3 (13,6)			67 (37,4)		23 (25,8)		
			AA	14 (16,9)	8 (11,9)		4 (4,2)	1 (4,5)			18 (10,1)		9 (10,1)		
Totalak	83 (100)	67 (100)	96 (100)	22 (100)		179 (100)	89 (100)								
AA	22 (27,2)	11 (16,4)	31 (32,3)	2 (8,7)	0,0132	53 (29,9)	13 (14,4)	0,0041							
19	mir-4707	rs2273626 (PM/seed)	AC	34 (42,0)	32 (47,8)	0,2876	45 (46,9)	15 (65,2)	0,0132	79 (44,6)	47 (52,2)	AA 0,40 (0,20-0,77) (rec)			
			CC	25 (30,9)	24 (35,8)		20 (20,8)	6 (26,1)		AC/CC 5,01 (1,10-22,72)(dom)	45 (25,4)		30 (33,3)		
			Totalak	81 (100)	67 (100)		96 (100)	23 (100)			177 (100)		90 (100)		
			TT	68 (42,5)	24 (34,8)		34 (35,8)	12 (63,2)		0,0272	102 (40,0)		36 (40,9)	0,2998	
			CT	70 (43,8)	33 (47,8)		51 (53,7)	4 (21,1)		CT 0,22 (0,07-0,75)	121 (47,5)		37 (42,0)		
20	mir-4431	rs6726779 (PM)	CC	22 (13,8)	12 (17,4)	0,2720	10 (10,5)	3 (15,8)	0,0272	32 (12,5)	15 (17,0)	0,2998			
			Totalak	160 (100)	69 (100)		95 (100)	19 (100)			255 (100)		88 (100)		
			AA	145 (91,8)	15 (83,3)		88 (93,6)	17 (85,0)		0,0295	233 (92,5)		32 (84,2)	0,0021	
			AG	13 (8,2)	2 (11,1)		6 (6,4)	1 (5,0)		GG 0 (rec)	19 (7,5)		3 (7,9)	GG 0 (rec)	
			GG	0 (0,0)	1 (5,6)		0 (0,0)	2 (10,0)			0 (0,0)		3 (7,9)		
21	mir-5682	rs9877402 (PM)	Totalak	158 (100)	18 (100)	0,0749	94 (100)	20 (100)	0,0295	252 (100)	41 (100)	0,0021			
			CC	49 (30,6)	21 (30,9)		30 (31,6)	12 (57,1)		0,0303	79 (31,0)		33 (37,1)	0,0314 (cod)	
			CT	82 (51,2)	27 (39,7)		49 (51,6)	5 (23,8)			CT/TT 0,35 (0,13-0,91)(dom)		131 (51,4)		32 (36,0)
			TT	29 (18,1)	20 (29,4)		16 (16,8)	4 (19,0)					45 (17,6)		24 (27,0)
			Totalak	160 (100)	68 (100)		95 (100)	21 (100)					255 (100)		89 (100)
TT	106 (66,2)	47 (68,1)	64 (66,7)	18 (75,0)	0,0444	170 (66,4)	65 (69,9)	0,4098							
22	mir-4432	rs243080 (PM)	CT	48 (30,0)	20 (29,0)	0,7304	30 (31,2)	3 (12,5)	0,0444	78 (30,5)	23 (24,7)	0,4098			
			CC	6 (3,8)	2 (2,9)		2 (2,1)	3 (12,5)		CC 6,71 (1,06-42,73)(rec)	8 (3,1)		5 (5,4)		
			Totalak	160 (100)	69 (100)		96 (100)	24 (100)			256 (100)		93 (100)		
			GG	84 (52,5)	46 (66,7)		60 (62,5)	18 (75,0)		0,2410	144 (56,2)		64 (68,8)	0,03254	
			CG	66 (41,2)	18 (26,1)		30 (31,2)	5 (20,8)		CG/CC 0,56 (0,20-1,53)(dom)	96 (37,5)		23 (24,7)	CG/CC 0,58 (0,35-0,96)(dom)	
23	mir-499a	rs3746444 (PM/seed)	CC	10 (6,2)	5 (7,2)	0,04534	6 (6,2)	1 (4,2)	0,2410	16 (6,2)	6 (6,5)	0,03254			
			Totalak	160 (100)	69 (100)		96 (100)	24 (100)			256 (100)		93 (100)		
			CG	66 (41,2)	18 (26,1)		30 (31,2)	5 (20,8)		CG/CC 0,56 (0,20-1,53)(dom)	96 (37,5)		23 (24,7)	CG/CC 0,58 (0,35-0,96)(dom)	
			CC	10 (6,2)	5 (7,2)		6 (6,2)	1 (4,2)			16 (6,2)		6 (6,5)		
			Totalak	160 (100)	69 (100)		96 (100)	24 (100)			256 (100)		93 (100)		
24	mir-146a	rs2910164 (PM)	GG	84 (52,5)	46 (66,7)	0,04534	60 (62,5)	18 (75,0)	0,2410	144 (56,2)	64 (68,8)	0,03254			
			CG	66 (41,2)	18 (26,1)		30 (31,2)	5 (20,8)		CG/CC 0,56 (0,20-1,53)(dom)	96 (37,5)		23 (24,7)	CG/CC 0,58 (0,35-0,96)(dom)	
			CC	10 (6,2)	5 (7,2)		6 (6,2)	1 (4,2)			16 (6,2)		6 (6,5)		
			Totalak	160 (100)	69 (100)		96 (100)	24 (100)			256 (100)		93 (100)		
			GG	60 (37,5)	34 (49,3)		43 (44,8)	12 (63,2)		0,1419	103 (40,2)		46 (52,3)	0,03452	
25	mir-4752	rs4112253 (PM)	CG	78 (48,8)	30 (43,5)	0,05378	41 (42,7)	5 (26,3)	0,1419	119 (46,5)	35 (39,8)	0,03452			
			GG	22 (13,8)	5 (7,2)		12 (12,5)	2 (10,5)		GG 0,82 (0,17-4,02)(rec)	34 (13,3)		7 (8,0)		
			Totalak	160 (100)	69 (100)		96 (100)	19 (100)			256 (100)		88 (100)		
			CG	78 (48,8)	30 (43,5)		41 (42,7)	5 (26,3)		GG 0,65 (0,42-1,01)(log)	119 (46,5)		35 (39,8)	GG 0,67 (0,46-0,98)rec	
			GG	22 (13,8)	5 (7,2)		12 (12,5)	2 (10,5)			34 (13,3)		7 (8,0)		
26	mir-6128	rs67042258 (PM)	GG	89 (56)	47 (69,1)	0,06157	54 (56,2)	12 (54,5)	0,1430	143 (56,1)	59 (65,6)	0,04218			
			AG	62 (39)	16 (23,5)		35 (36,5)	6 (27,3)		AG 0,49 (0,25-0,94)	97 (38,0)		22 (24,4)	AG 0,55 (0,32-0,96)	
			AA	8 (5)	5 (7,4)		7 (7,3)	4 (18,2)		AA 1,18 (0,37-3,82) (cod)	15 (5,9)		9 (10,0)	AA 1,45 (0,60-3,51)(cod)	
			Totalak	159 (100)	68 (100)		96 (100)	22 (100)			255 (100)		90 (100)		
			GG	89 (56)	47 (69,1)		54 (56,2)	12 (54,5)		0,1430	143 (56,1)		59 (65,6)	0,04218	

Laburdurak: AM, kontrolen maiztasun txikikoena duen aleloa; OR, Odds Ratio; KT, Konfidantza-tartea; kod, kodominantea; dom, dominantea; errez, errezesiboa; log, log-aditiboa; PM: miRNA pre-heldua, M: miRNA heldua; GK: Gune kromosomikoa *Adierazgarria Bonferroniaren zuzenketaren ostean.

Bestalde, maiztasun alelikoen bidezko asoziazio-analisan 3 polimorfismok 3 miRNA OS arriskuarekin asoziatuak zeuden ($p < 0,05$) (33. Taula). Emaitza interesgarrien artean, rs2273626 SNPa mir-4707 miRNaren seed gunean kokatuta dago. Emaitza hauek maiztasun genotipikoekin alderatuz, SNP berria topatu genuen OSren arriskuarekin asoziatuta: rs2042253 SNPa mir-5197 miRNAn.

Tabla 34. Maiztasun alelikoen bidezko asoziazio-analisen emaitzen laburpena bi populazioak batera analizatuz.

	Genea	SNP	Kokapena	GK	Aleloa	Maiztasuna kontrolatan	Maiztasuna kasuetan	OR (%95KT)	P
1	mir-576	rs77639117	PM	4q25	T	0,014	0,062	4,75 (1,81-12,46)	0,0005
2	mir-4707	rs2273626	PM/seed	14q11	C	0,477	0,609	1,71 (1,18-2,47)	0,0044
3	mir-300	rs12894467	PM	14q32	T	0,371	0,489	1,62 (1,148-2,86)	0,0058
4	mir-4268	rs4674470	PM	2q35	T	0,763	0,858	4,99 (3,19-7,83)	0,0078
5	mir-3188	rs7247237	PM	19p13	T	0,309	0,414	1,57 (1,106-2,52)	0,0116
6	mir-4745	rs10422347	M/PM	19p13	T	0,075	0,138	1,98 (1,15-3,41)	0,0124
7	mir-5682	rs9877402	PM	8q22	G	0,038	0,100	2,84 (1,15-7,01)	0,0188
8	mir-4752	rs4112253	PM	19p13	C	0,635	0,727	1,53 (1,05-2,24)	0,0256
9	mir-146a	rs2910164	PM/seed	5q34	G	0,750	0,824	1,56 (1,008-2,41)	0,0449

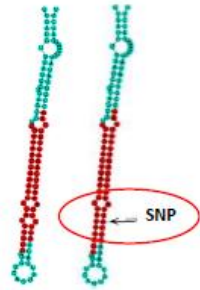
Laburdurak: AM, kontrolen maiztasun txikikoena duen aleloa; OR, Odds Ratio; KT, Konfidantza-tarte; PM: miRNA pre-heldua, M: miRNA heldua; GK: Gune kromosomikoa *Adierazgarria Bonferroniren zuzenketaren ostean.

Bestalde, maiztasun alelikoen bidezko asoziazio-analisan 9 polimorfismok 9 miRNA OS arriskuarekin asoziatuak zeuden ($p < 0,05$) bi populazioak batera. Bai rs2273626 mir-4707 eta rs2910164 mir-146a miRNAtan seed gunean kokatuta zeuden. Bederatzi SNP hauek ere OS arriskuarekin asoziatuak topatu genituen maiztasun genotipikoekin bidezko analisia (34. Taula).

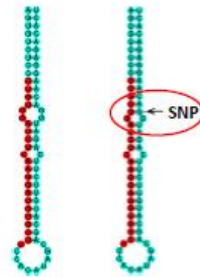
2.3.6 ESPAINIAKO ETA ESLOVENIAKO POPULAZIOAREN MIRNA IN SILICO ANALISIA

Populazioak batera analizatu genuenean rs2910164 SNPa mir-146ak miRNAk eta rs4112253 SNPa mir-4752 miRNAn bigarren mailako miRNA egitura aldatu zuten (29. Irudia).

mir-146a



mir-4752



29. irudia miRNAren bigarren mailako egitura aldatzen zuten OSren arriskuarekin asoziatuta zeuden mir-SNPak, miRNASNP datubasearen iragarpena.

EZTABAIDA

Tesi proiektu honen helburu nagusia OS pediatrikoen arriskuaren markatzaile genetiko berrien bilaketa zen. Horretarako, lehendabizi, literaturan OSren suszeptibilitatearekin asoziazioaturik zeuden markatzaile genetikoak ezartzeko bilaketa bibliografikoa egin genuen. Bilaketa honetan, aztertutako aldaera genetiko guztietatik (n=5250 SNP), soilik hiru SNP bi OS arriskuarekin asoziazio sendoa erakusten zutenak (hau da, asoziatu eta balidatutako SNP bakarrak): rs1690916 y rs2279744 *MDM2* genean eta rs231775 *CTLA4* genean. Hori dela eta, emaitza hauek balidatzeko helburua genuen. *MDM2* genearen polimorfismoei dagokiola, ez genuen OS arriskuarekin asoziazio adierazgarri aurkitu ez asoziazio-analisan, ezta populazio guztiekin egindako meta-analisan ere. Horrez gain, gure meta-analisan jasotako emaitzak gure helburu bera zuen beste meta-analisi batekin kontraesanean zegoen. Argitaratutako meta-analisi horren berrikuspena egin ondoren, Liu et al-en taldeak (Liu et al., 2014) eta gure taldeak zenbait akats topatu genituen. Bestalde, *CTLA4* genean dagoen rs231775 OS arriskuarekin asoziatuta dago Espainiako populazioan. Beraz, emaitza hauek, rs231775 SNPa *CTLA4* genean OSren suszeptibilitatearen markatzaile genetikoaren bakarra izan daitezkeela adierazten dute. Gene kodetzailen aldaera genetikoaren gainean behatutako emaitza eskasak direla eta gene ez kodetzailen, miRNAak zehazki, aldakortasun genetikoaren azterzea erabaki genuen. Horretarako, alde batetik, miRNA prozesamendu geneak eta bestalde, miRNAetan polimorfismoak aztertu genituen. MiRNA prozesamenduari dagokiela hiru SNP OS arriskuarekin asoziatuak topatu genituen RISC konplexuan konkretuki *CNOT1*, *CNOT4* eta *SND1* genetan. miRNAen aldakortasun genetikoaren azterketa estentsiboan 26 SNP 25 miRNAren OS arriskuarekin asoziazio adierazgarri izan genituen. Hauen artean, 4 polimorfismo 14q32 miRNA klusterreko 4 miRNAren kokatuta. Kluster honetako zenbait miRNA *MYC* genea erregulatzen dutela behatu da OSn. Hortaz, 14q32 klusterreko miRNAa OSren suszeptibilitatearen *hotspot*-a izan daiteke. Bi populazioak batera aztertu genituenean hiru miRNA berri (mir-146a, mir-4752 eta mir-6128) OSren arriskuarekin asoziatuak topatu genituen. Hortaz, hiru polimorfismo hauek miRNAen populazio orokorraren OSren markatzaile potentzialak izan daitezke.

1. *MDM2* GENEAREN AZTERKETA

OSren suszeptibilitatearekin asoziaturik zeuden markatzaile genetikoen bilaketa bibliografiko sakona egin ostean, aztertutako aldaera genetiko guztietatik ($n=5250$ SNP), hiru SNP izan ziren emaitzarik garrantzitsuenak (gutxienez bi artikulu baino gehiagotan asoziaturik topatu genituelako). Haietako bi (rs1690916 eta rs2279744) *MDM2* genean.

MDM2 genea 12q14.3 gune kromosomikoan kokatuta dago eta 37.373 bpko luzera du. *MDM2* geneak E3 ubiquitin ligasa nuklearra (*MDM2*) kodetu eta p53 proteina tumore-ezabatzailearen degradazioa erregulatzen du (32). Era berean, *TP53* genea induzitutakoan *MDM2* genearen promotorea trans-aktibatzen du. Sistema horren bitartez, *MDM2* eta *TP53* geneak elkar erregulatzen dira ziklo zelularra edota apoptosia aktibatuz (152). OSren %10 kasuetan *MDM2* anplifikatuta dago (3). Ildo honetatik, zenbait ikerketa lanek gene hau OS arriskuarekin asoziatu dute. Orain arte, 7 polimorfismo deskribatu dira OS arriskuarekin asoziaturik (33-36, 54), hauetatik, bik (rs1690916 y rs2279744) asoziatu eta balidatu diren bakarrak dira. rs1690916 SNPa 3'UTR gunean kokatuta dago eta hori dela eta, mRNA egitura eta egonkortasunean aldaketak sor ditzake, mRNA batez besteko bizitza aldatuz (153). Bestalde, rs2279744 Sp1-ak transkribapen faktorearen loturaren afinitatea hobetzen du *MDM2*ren kontzentrazio basala emendatuz (30). Kontzentrazio emendio honek p53ren erantzun apoptotikoa murrizten du eta horrek, tumoreak sortzea dakartza (154). Arrazoi hauek direla eta, bi SNP hauek OSren jatorrian parte hartzea logikoa da. Alabaina, gure ikasketan ez genuen OSren arriskuarekin asoziaziorik topatu.

Gure azterketan rs1690916 eta rs2279744 SNPek ez zuten OSren arriskuarekin asoziaziorik erakutsi, GWA azterketarekin bat (58). Ostera, Toffoli et al., 2009 eta Mirabello et al., 2011-ek rs1690916 eta rs2279744-ren asoziazio hauek baieztatu zituzten (33, 35). Emaitzen akordio ezak Maren bitartez argitzea erabaki genuen lagin tamaina eta botere estatistikoa emendatuz. Gure MAN, PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*) gidaren argibideak jarraitu genituen kalitatezko azterketa izan zedin: bilaketa bibliografikoaren estrategia aurretik zehaztuz; artikulu hautaketa eta haien datu-erazketa bi ikertzailek modu independentean eginez; artikulu guztien kalitatea ebaluatuz; datu genotipikoen balio absolutu guztiak edo asoziazio-analisan lortutakoak lan honetan azalduz.

rs1690916 SNPren MAN 4 populazioen 464 OS kasu eta 2048 kontrol erabiliz ez genuen asoziaziorik topatu (OR: 0,89; IC 95%: 0,54-1,45, eredu alelikoa; OR: 0,80; IC 95%: 0,28-2,29, eredu kodominantea; OR: 0,80; IC 95%: 0,40-1,60, eredu errezesiboa; OR: 0,87; IC 95%: 0,44-1,74, eredu dominantea). Alde batetik, maiztasun txikiena zuen aleloa (A) OSren arriskua

areagotzen zuen populazio espainiarrean eta esloveniarrean eta bestalde, alelo bera arriskua murrizten zuen populazio errusieran eta amerikarrean. Emaidza hauek OR kontraesankorra erakusten dute populazioen artean beraz, ezin izan genuen arrisku-tendentzia zehaztu populazio orokorrean.

rs2279744 SNPren MAn 5 populazioen 433 OS kasu eta 1959 kontrol erabiliz, berriro ere, ez genuen asoziaziorik topatu (OR: 1,16; IC 95%: 0,87-1,54, eredu alelikoa; OR: 1,33; IC 95%: 0,74-2,42, eredu kodominantea; OR: 1,27; IC 95%: 0,77-2,10, eredu errezesiboa; OR: 1,22; IC 95%: 0,90-1,66, eredu dominantea). Kasu honetan, maiztasun txikiena duen aleloa (G) OS arriskua areagotzen zuen populazio amerikarrean, australiarrean eta italiarrean eta murrizten zuen populazio espainiarrean eta esloveniarrean, aurreko kasuan bezala ezin izan genuen ondorio argirik lortu.

Tesi-proiektua hasita zegoela, rs1690916 y rs2279744 eta OS arriskua aztertu zuen MA plazaratu zen (151). MA honetan bi polimorfismo hauek OSren arriskuarekin asoziatuta zeudela adierazi zuten, gure emaitzekin kontraesanean.

MA honen emaitzak zalantzan jartzen zituen gutuna argitaratu zuten (155). Artikulu kopuru murrizta eta kalitate eskasa, metodoei buruzko informazio falta eta kontrol populazioaren HW orekaren analisi falta adierazi zuten. Hau da, ez zituzten PRISMA gidaren argibideak jarraitu.

Ildo honetan, gure taldeak ere beste akats batzuk topatu zituen Wang et al. MAn. rs1690916 polimorfismoaren kasuan Naumov eta kolaboratzaileen artikulutik kontuan hartutako OS pazienteen populazioan beste hezur-tumoredun pazientzeak zeudela egiaztatu genuen (36). Horrela, hezur tumoreen (OS laginak bakarrik erabili beharrean) laginak erabilia OR balio adierazgarriak lortu zituzten (OR: 0,60; %95KT: 0,46-0,77). rs2279744 SNParen kasuan, maiztasun genotipiko edo/eta alelikoen berririk ez zen ematen, hori dela eta, artikulu orijinaletik datu genotipikoak erauzi behar izan genituen. Artikulu haietatik Ito eta kolaboratzaileen kontrol taldea zehaztea zaila zen. *A priori* kontrol talde gisa erabili zitekeen bakarra tumore onbeeren taldea zen (34). Oro har, suszeptibilitate azterketetan kontrol taldeak ezin dute beste gaixotasunik eduki, ezaugarri amankomun hori duten taldeek populazio orokorrarekiko ezaugarri genetiko ezberdinak izan ditzaketelako, hau da, talde horretan gaixotasunari asoziaturiko genotipo aldeko hautespena gerta daiteke (142). Talde honekin asoziazio-analisia egin genuenean ez genuen asoziazio adierazgarririk topatu (OR: 1,16; %95KT: 0,87-1,54, eredu alelikoa), haien MAn jasotako emaitzen kontrara (OR: 1,60; %95KT: 1,23-2,07).

Gure MAn kalitatea hobetu eta lagin kopurua emendatu arren OS populazio berriak beharrezkoak dira oraindik lagin tamaina mugatua delako OSren intzidentzia maiztasun txikia dela eta.

Laburbilduz, bilaketa bibliografikoa egin ondoren, *MDM2* polimorfismoen asoziazio-analisia eta ondorengo MAn arabera, rs1690916 eta rs2279744 ez zuten OSren arriskuan parte hartzen.

2. CTLA4 GENEAREN AZTERKETA

OSren arriskuarekin gehien asoziatuak hirugarren aldaera genetikoak rs231775 CTLA4 genean izan zen.

Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 genearen (CTLA4 edo CD152), 2q33.2 gune kromosomikoan kokatuta dago eta immunoglobulinen superfamiliaren parte da eta T zelulen gainazalean adierazten da erantzun immunologikoen aurrean. CTLA4-k T zelulen proliferazio eta aktibazioaren erregulazio negatiboa dakar eta seinalea igortzean T zelulen ziklo zelularra gelditu eta zitokinen ekoizpena murrizten du (156). Ondorioz, T zelulen azpi-erantzuna hauen erantzun antitumoralak murrizten du eta hori dela eta, minbizien suszeptibilitatea areagotzen du (37, 38). Zenbait ikerketa lanek CTLA4 genearen polimorfismoak gakoak izan daitezke zenbait minbizien sorrerarako, hala nola, kolon eta ondesteko minbizia (157), biriketako minbizia (158), umetoki-lepoko minbizia (159) eta urdaileko eta bularreko minbizia (160). Contardi et al. CTLA4 OS zelula tumoraletan adierazten dela eta zelula hauen apoptosian parte hartzen du beraz, OSren garapenean inplikaturik egon daiteke (161). Izan ere, 3 polimorfismo deskribatu dira OSren arriskuarekin asoziatuak (55, 56, 116, 162, 163) eta haietatik bakarra (rs231775) OSren suszeptibilitatearekin asoziatuta topatu dute bi aldi baino gehiagotan (116, 162). rs231775 SNPa, +49 A/G ere moduan ezagutzen da, genearen lehenengo exoian kokatuta dago. Aldaera hau irakurtarauaren zentzua aldatzen du (ACC>GCC), eta beraz, proteinaren sekuentzia aldatzen du (Thr>Ala), eta hortaz, bere funtzioa alda dezake.

Gure azterketan, AG+GG genotipoak (versus AA) babeseko genotipoa aurkitu genuen populazio espainiarrean (OR: 0,45, %95KT: 0,24-0,83). Hortaz, AA genotipoa OSren arriskuarekin asoziatuak zegoen. Emaizta hauek, aurretik argitaratutakoekin bat zeuden non AA genotipoak (OR: 2,20, %95KT: 1,23–3,95 eta OR: 2,27, %95KT: 1,21–4,25) OSren arriskua areagotzen zuten.

Hiru populazioak kontuan hartuta emaitza hauek MA bidez baieztatu genuen non bai AA genotipoak (OR: 2,07, %95KT: 1,48- 2,89) OSren arriskua areagotzen zuten. Gure emaitzekin bat, SNP hau jadanik asoziatu dute biriketako minbiziarekin (158), umetoki-lepoko minbiziarekin (159), Ewing-en sarkomarekin (164), urdaileko eta bularreko minbiziarekin (165) eta kartzinoma hepatozelularrekin (166). Aldaera honen asoziazioak azalpen funtzioanala du jadanik. SNP honen +49A aleloak aminoazido aldaketa dakar (Thr>Ala), eta aldaketa honek

CTLA4 immunoglobulinaren ekoizpena eta eraginortasunaren emendioa eragiten du (40, 167). Hortaz, erantzun antitumoralak murriztu daitezke eta OSren suszeptibilitatea areagotu.

Gure emaitzen arabera, rs231775 SNPa OS arriskuarekin asoziatu genuen. Hortaz, *CTLA4* genean gerta daitezkeen aldaketak garrantzitsuak izan daitezke OS patogenesisian eta beraz, *CTLA4* genea OS suszeptibilitatearen markatzailea izan daiteke.

3. MIRNAEKIN ERLAZIONATUTAKO GENEEN AZTERKETA

Gene kandidatuen estrategia erabiliz eta OSren suszeptibilitatea aldaera genetikoaren bitartez aztertu dituzten artikulu guztiak kontuan hartuta, *CTLA4* genearen rs231775 OSren arriskuaren markatzaile bakarra izan daitekeela behatu genuen. Beraz, gene kodetzailetan dauden emaitzen eskasia kontuan hartuta eta azken hamarkadetan, gene ez kodetzaileak hartu duten garrantzia dela eta, OSren arriskuaren markatzaile genetikoak gene hauetan bilatzea erabaki genuen. Hauen artean, miRNAk gehien aztertutakoak dira eta minbizien jatorri eta bilakaeran paper garrantzitsua jokatzen dute. OSn adierazpen aberrantea erakutsi duten miRNAk hezuraren sorreran eta zelulen proliferazioan, migrazioan eta inbasioan parte hartzen duten geneak erregulatzen dituzte. Ondorioz, miRNAen adierazpen mailen aldaketak bai OSren bilakaeran zein jatorrian inplikaturik egon daitezke. miRNA adierazpen maila hauek, miRNAk prozesatzen laguntzen duten genetean (miRNA prozesamendu-geneak, hain zuzen ere) aldaketak gertatzeagatik gauzatu daitezke. Izan ere, gene hauetako zenbait aldaera genetiko jadanik zenbait minbiziekin asoziatu dituzte. Hori dela eta, gene hauen aldakortasun genetiko guztia aztertzea erabaki genuen.

3.1 MIRNAEN PROZESAMENDU GENEEN SNPEN AZTERKETA

Hogeiabat miRNA prozesamendu genetean 72 SNP aztertu eta gero, hiru SNP (rs11866002, rs3812265 y rs3823994) RISC konplexuko 3 genetean (*CNOT1*, *CNOT4* eta *SND1*) OSren arriskuarekin asoziatuak topatu genituen. Hauetatik, *CNOT1* eta *CNOT4* geneak CCR4-NOT konplexua osatzen duten RISC konplexu barruan (168, 169). Horrez gain, Bonferroniaren zuzenketaren ostean, *CNOT1* genean rs11866002 SNPa asoziazio balioa ia adierazgarritasun mailetara heldu zen ($P=0,08$).

Gure azterketan, rs11866002 polimorfismoaren CC genotipoa OSren arriskuaren murrizketarekin asoziatuak topatu genuen. SNP hau, 22. exoian kokatuta dago eta aldaketa sinonimoa dakar (CAG >CAA, *reverse* harizpia), hau da, ez du aminoazido sekuentzia aldatzen (Gln>Gln), baina bere kokapenagatik moztitsazketaren erregulazioan eragin dezake (F-SNP) (170) eta adierazpen aldaketak sortzen ditu (171). Izan ere, *CNOT1* genearen adierazpena genotipoaren arabera aldatzen dela behatu da HapMap populazio ezberdinetan (172).

rs11866002 polimorfismoaren CC genotipoa hurren leukemia linfoblastiko akutuen arriskuarekin ere asoziatu topatu zen (87). Baliteke, rs11866002 SNPa minbiziarekin orokorrean asoziatuta egotea. Bestalde, *CNOT4* genearen rs3812265 SNParen CT+TT genotipoak OSren arriskua areagotzen zuen ($p=0,025$). Hamargarren exoian kokatuta dagoen SNP hau *missense* aldaera da, hau da, nukleotido aldaketa sortzen du (GTA>ATA, *reverse* harizpia) eta proteinaren sekuentzia aldatzen du (Val>Ile) (170), eta ondorioz, bere funtzioan eragin dezake. RISC konplexuaren barnean, CCR4-NOT konplexuak mRNA ituen poli(A) isatsa mozten du (173). Hortaz, *CNOT1* eta *CNOT4* geneak mRNAen deadenilazio prozesu hau alda dezakete, OSren jatorri eta bilakaeran parte hartzen duten geneen adierazpena aldatuz.

Azkenik, *SND1* genearen rs3823994 SNPa TT genotipoaren OS arrisku-murrizketarekin asoziatu genuen. Polimorfismo hau 16. exoian kokatuta dago eta potentzialki mostitzasketaren erregulazioa aldatzen du (F-SNP). RISC konplexuaren barruan, *SND1* geneak nukleasa funtzioa du (174), miRNA editatuaren degradazioa erregulatuz (175). Zenbait autoreek gene honetan adierazpen aldaketak somatu dituzte kartzinoma hepatozelularrean (176) eta lehen mailako azaleko melanoma gaiztoan (177). OSren kasuan *SND1* genearen adierazpen aldaketa OSren garapenean inplikaturik dauden miRNA mailak aldatu ditzake. Izan ere, *SND1* gene-isiltzeak miR-17-92 klusterreko miRNA helduen gain-adierazpena eragiten duela behatu da (178). Kluster hau OSn gain-adierazita dago eta OS zelulen proliferazio, inbazio eta migrazioarekin asoziatu da (179).

miRNA prozesamendu-geneen aldakortasun guztia aztertu ostean, RISC konplexuko *CNOT1*, *CNOT4* eta *SND1* geneetako hiru SNPak OSren suszeptibilitatearekin asoziatu topatu genituen. Konplexu hau 15 genek osatzen dute eta miRNAekin batera (miRISC) mRNA ituen degradatuz zein haien itzulpena inhibitzen dute (180). Zenbait lanek, RISC konplexuko geneen adierazpen aldaketak miRNA ituen isilarazpenean eragiten duela aitortu dute. Esate baterako, *TNRC6A* genearen deplezioak mRNA askoren gain-adierazpena dakar (181). Era berean, konplexu honen geneen adierazpen aldaketak ere miRNAen mailak aldatzen dituzte. Esate baterako, *EIF2C2* genearen adierazpen aldaketak miRNA gain-adierazpenarekin korrelazionatu da mieloma anizkoitzean (182). Hori dela eta, RISC konplexuko zenbait partaideen SNPak haien funtzioan eragin dezakete eta miRNA bidezko mRNA erregulazioa aldatu.

Gerora, miRNA prozesamendu geneen aldakortasun genetikoak Weng Y eta kolaboratzaileen taldeak aztertu zuten *GEMIN4* (komplejo RISC), *DROSHA* (komplejo DROSHA/DGCR8) eta *DICER1* (komplejo DICER) (183). Emaitzen ezberdintasuna alde batetik,

populazioen jatorrian egon daiteke (asiatikoa vs europearra, gure kasuan). Horrez gain, azterketa honetan miRNA prozesu geneen hautaketa egin zen (*AGO1*, *DDX17*, *DDX5*, *DICER1*, *DROSHA*, *GEMIN4*, *RAN*, *SNIP1* eta *XPO5* geneak) eta ez ziren CCR-NOT partaideen generik aztertu. Hala eta guztiz ere, ikerketa-lan honek miRNA prozesamendu geneen inplikazioa sendotzen du OS suszeptibilitatean.

Ondorioz, lehenengo aldiz, RISC konplexuaren genetan SNPak (rs11866002 *CNOT1* genean, rs3812265 en *CNOT4* genean eta rs3823994 *SND1* genean), OS suszeptibilitatearekin asoziaturik topatu genituen bilatu genituen.

3.3 MIRNA GENEEN SNPEN AZTERKETA

miRNAen adierazpen aberrantea miRNAetan dauden aldaera genetikoei egotzi dakioke. Aldaketa hauek miRNA mailei zein mRNA ituen loturek eragin ditzakete. miRNA polimorfismoak (mir-SNPak) jadanik minbizien sorrerarekin asoziatu dira. Izan ere, argitaratutako lan guzti hauek bilaketa sistematiko eta meta-analisiak plazaratu dira hala nola, mir-146a miRNAen rs2910164, mir-149 miRNAen rs2292832 eta mir-196a2 miRNAen rs11614913 (107, 108). Hala ere, mir-SNPak minbiziaren garapenean garrantzizkoak izan arren OSn oraindik ez dira sakonki aztertu.

Azterketa honetan, 213 polimorfismo 206 pre-miRNA genetan modu arrakastatsuan analizatu genituen 100 OS kasuan (<34 urte) (74 kasu populazio espainiarrean eta 26 populazio esloveniarrean) eta 256 kontrol. Guztira, 14 SNP 14 pre-miRNAetan OSren arriskuarekin asoziatuak topatu genituen populazio espainiarrean eta 9 SNP 8 pre-miRNAetan populazio esloveniarrean ($p < 0,05$). Bi populazioak batera analizatzerakoan 12 SNP 12 pre-miRNAetan OSren arriskuarekin asoziatuak topatu genituen.

Populazio espainiarrean rs12894467 SNParen TT genotipoa miR-300 miRNAen emaitzik adierazgarriena izan zen (OR=2,01). Horrez gain, populazio biak kontuan hartuta ere emaitza adierazgarriak erakutsi zituen (OR=1,62). Mir-300 miRNA 14q32 gune kromosomikoan dagoen miRNA klusterrean kokatuta dago. Zehazki OSn, kluster honetako zenbait miRNA (miR-382, miR-134, miR-544 eta miR-369-3p) azpi-adierazita daude, eta hauek modu kooperatiboan *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homologue (avian)* (MYC) genea gain-adierazten dute (184). MYC genearen aktibazioak OSren patogenesisian paper garrantzitsua jokatzen du hezurmuineko estroman kokatuta dauden zelulen transformazio prozesuan (OS zeluletara) inplikaturik dagoelako (185). Horrez gain, miRNA hauen inplikazioa tumorigenesian Thayanithy eta kolaboratzaileak erakutsi zuten. Izan ere, miRNA hauek blokeatzean osteoblastoen ahalmen proliferatiboa, migratzailea eta inbasiboa areagotzen du.

Gure emaitzak azaldu daitezke T aleloak rs12894467 SNPan mir-300 miRNAren azpi-adierazpena ekar dezakelako eta honek MYC genearen gain-adierazpena eragin. Horrez gain, gure analisian kluster honetan dauden beste 3 miRNA polimorfiko (mir-4309, mir-656 eta mir-412) ere OSren arriskuarekin asoziatuak topatu genituela. Hortaz, gure emaitzak kontuan hartuta eta miRNAen adierazpen aldaketa OSn behatu direla berrantolaketa genomikoengatik (101) 14q32 guneko miRNA klusterra OSren jatorriaren *hotspot*-a izan daitekela uste dugu.

rs356125 mir-2278 miRNAn 9q22 gune kromosomikoan kokatuta dago. Polimorfismo honen G aleloak OSren arriskua areagotzen zuen populazio espainiarrean (OR=9,8). Hala ere, asoziazio hau ezin izan zen balidatu populazio esloveniarrean ezta populazio biek in batera eta hori dela eta, populazio espainiarraren ezaugarria izan daiteke. Mir-2278 *C9orf3*ren gune intronikoan kokatuta dago eta M1 zink menpenko aminopeptidasen familiakoa. Gene hau zutitzearen disfuntzioarekin eta obario polikistikoen sindromearekin asoziatuta ikusi da; gaixotasun hauek sexu-hormonen kopuru ezegokia edukitzeagatik gertatzen dira (187, 188). OSren etiologiaren kausetako bat hormonen aldaketak izan daiteke zenbait autorek aitortu duten moduan (28), hortaz, polimorfismo honen asoziazioa azal dezake.

mir-576-an kokaturik dagoen rs77639117 SNParen T aleloak OS arriskua areagotzen zuen (OR=5,85). Emaizta hauen ildotik, AT/TT genotipoak OSren arriskua emendatzen zuen populazio biak elkartutako analisisian (OR=4,83). miRNA honen adierazpena OSn aztertu da emaitza kontraesankorrekin: Won KY et al. eta Maire G et al., ez zuten adierazpen aldaketarik somatu (8 kasu baino gutxiago analizatuz) (101, 189), eta Sarver et al.-ek aldiz gain-adierazpena topatu zuten 15 OS laginetan (190). Mir-576 miRNAREN itu genetako bat *RB1* gene tumore-ezabatzailea da (Mirwalk-en *in silico* analisisa). Gene hau sarrera atalean komentatu dugun moduan OSn garrantzi handikoa da, izan ere, OS esporadikoen %35en kasuan inaktibatuta dago mutazio eta heterozigositatearen galerengatik (3). Guzti hau kontuan hartuta, rs77639117-T aleloak mir-576 miRNAREN gain-adierazpena ekar dezake eta hori *RB1* genea azpi-adierazi eta bere inaktibazioa ekar dezake. Beraz, mir-576 miRNA, *RB1* genearen inaktibazioarentzat mekanismo alternatiboa izan daiteke.

Mir-3188 miRNAn dagoen rs7247237 SNPa ere OSren arriskuarekin asoziatu topatu genuen, 19p13 kokatuta. Kasu honetan, TT genotipoak populazio espainiarraren arriskua areagotzen zuen (OR= 3,59). Bi populazioak batera aztertzen ere adierazgarria izan zen (OR=2,35), baina ez populazio esloveniarrean. miRNA honen gene ituek ez dira zehazki ezagutzen, baina interesgarria da *jun D proto-oncogene (JUND)* proto-onkogenearen urgora kokatuta dagoela. Gene honek JUND proteina kodetzen du eta *activator protein 1 (AP1)* transkribapen faktorearen osagaietako bat da. AP1 jarduera transkripzionala inhibitzean OS zelulen ahalmen migratzaile, inbasibo eta metastikoa blokeatzen da saguetan (191).

rs2289030 polimorfismoa mir-492 miRNAn bostgarren polimorfismorik adierazgarriena da eta GG gaixotasunaren babeseko genotipoa izan zen. MiRNA honen gain-adierazpena *P TEN* gene tumore-ezabatzailearen azpi-adierazpena sortzen du gibelesko minbizian (192). Bestalde, OSn egindako bi azterketetan ez zuten adierazpen aldaketarik somatu (101, 189); hala ere,

emaitza hauek kontu handiz hartu behar dira aztertutako lagin kopurua oso baxua zelako (≤ 7 OS lagin). *PTEN* geneak *PTEN* proteina kodetzen du, PI3K bidezidorraren aktibazioan parte hartzen duen fosfatasa da eta ziklo zelularren jarraipenean modulatu du eta ondorioz, zelulen biziraupenean eraginez (193). Zenbait ikerketa lanek *PTEN* azpi-adierazita dago OS pazientetan eta OS lerro zelularretan, mir-128 eta mir-17 miRNAen gain-adierazpena dela eta (149, 194, 195). Horrez gain, OS lerro zelularretan *PTEN* gain-erregulazioa gertatzen da eta honek zelula tumoralen atxikipenean, migrazioan eta inbasioaren ahalmena murrizten du (196). Emaitza hauek kontuan hartuta, rs2289030 SNParen GG genotipoak mir-492ren gain-adierazpena ekar dezake eta miRNA kopuru emendioagatik *PTEN* genearen adierazpena murriztu daiteke. Ildo honetatik, *in silico* analisiak diotenaren arabera, rs2289030-C aleloak mir-492ren bigarren mailako egitura aldatzen zuen, bere prozesamendua eta azken batean, miRNA mailak aldatuz.

rs10505168 polimorfismoa mir-2053 miRNA seigarren polimorfismorik adierazgarriena izan zen populazio espainiarrean, non AG genotipoak OSren arriskua emendatzen zuen (OR=2,02). Hala ere, emaitza hau ez zen populazio esloveniarraren eta biak batera adierazgarria izan. MiRNA honeri ez zaizkio iturri generik ezagutzen. Hala ere, *gen CUB and Sushi multiple domains 3 (CSMD3)* gene intronikoan kokatuta dago 8q23 zonaldean. Gene honetako SNPak 8q24 gene kromosomikoan, *MYC* onkogenea dagoen tokian, dauden SNPekin lotuta daude populazio kaukasikoan (197).

Analisi honen zazpigarren emaitzik adierazgarriena rs60871950 polimorfismoa izan zen mir-4467 miRNA kokatua. Polimorfismo honen AA genotipoak babesa ematen zuen OSn (OR=0,39). Hala ere, asoziazio hau ez zen populazio esloveniarraren ezta batera analizatzerakoan. MiRNA hau glioman gain-adierazita topatu da eta *SF1* genearen erregulazioan parte har dezake (198) eta DNAren konponketa prozesuetan inplikaturik dago (199). DNAren konponketaren prozesuan akatsak gertatzen direnen OSren jatorrian gakoak dira (28), beraz, rs6087195 SNPak mir-4467 miRNAren adierazpen aldaketak ekar ditzake eta beraz *SF1* genea aldatu.

Mir-5196 miRNA rs10406069 SNParen OSren arriskuarekin ere asoziatu topatu genuen. miRNA hau *CD22* genearen 12. exoiarekin gainezartzen da genomatik. Gene hau giza B linfozitoen gainazalean kokatzen den antigenoa kodetzen du (200). Nahiz eta sistema immunologikoa OSn duen papera guztiz argi ez egon (201), sistema honetan parte

hartzen duten beste antigenoetan ere (*CTLA4* genea, kasu) aldakortasun genetikoa OSren suseptibilitatearekin asoziatu dute (55-57).

Beste emaitza interesgarri bat rs702742 mir-378h miRNAn topatutakoa da ($p=0,022$). Mir-378 a/b/c/d/e/f/h/i-ak ebolutiboki oso kontserbatutako miRNA familia da eta OSren ehun tumoralean gain-adierazita dagoela behatu da (101, 190, 202-204). Horrez gain, miR-378 zelula mesenkimaletatik osteoblastoen ezberdintzapenean parte hartzen du prozesu honetako zenbait gene erregulatzen dituelako (205-207). Alde batetik, You L eta kolaboratzaileen taldeak miR-378 miRNA modu ektopikoan gain-adieraziz osteoblastoen mineralizazioa suspertzen duela behatu da *CASP3* genea erregulatuz (mir-378ren itua) (205). Bestalde, Kahai et al-en taldeak miR-378 gain-adierazpena osteoblastoen ezberdintzapen goiztiarra erreprimitzen duela *nefronectin* genea (*NPNT*) gene-isilaratzeagatik, osteogenesiaren induktorea (207). Azkenik, mir-378 ezberdintzapen osteogenikoaren erregulazioan parte hartzen du *bone morphogenetic protein 2* genearen (*BMP2*) bidez. Gene hau hezu eta kartilagoaren eraldaketa sustatzen duen transkripzio-faktorea da (206). BMP2ren maila anormalek anomalia kongenitoak eta hezur, kartilago, muskulu eta gantzera eratortzen diren zelula mesenkimalak inplikaturik dauden gaixotasunak sortzen dituzte (208). Gure azterketan, GG genotipoak rs702742 mir-378h miRNAREN gain-adierazpena ekar dezake eta aurretik komentatutako bidezidorraren bitartez osteoblastoen jardueran eragin. Ondorioz, rs702742 SNPa mir-378h miRNAn garrantzizkoa izan daiteke osteosarkomagenesian.

mir-4745 dagoen rs10422347 SNPn TT+CT genotipoak miRNAn OSren arriskua emendatu zuen ($OR=2,30$) ere. Literaturan ez da deskribatu miRNA honetarako itua generik. Hala ere, miRNA hau *polypyrimidine tract binding protein 1* (*PTBP1*) genearen zazpigarren intronetik transkribatzen da eta mostitzazketa prozesuan inplikaturik dago (209). Gene hau glioblastoma bezalako minbiziekin erlazionatu da (210), non *PTBP1* geneak pirubato kinasa entzimak moztitsasketa aldatzen duen eta honek glukosaren metabolismoa aldatzen du minbizi zeluletan behatzen den Warburg efektua aktibatuz (glikolisi anaerobioa) (211, 212). *In silico* analisisien bitartez, polimorfismo honen T aleloak GATA-1 eta GATA-2 transkribapen faktoreen lotura gune berria sortzen du, eta horrela, OSn glukosaren metabolismoan eragin dezake pirubato kinasaren moztitsasketa aldatuz.

Azkenik, rs35770269 SNParekin asoziazio adierazgarria topatu genuen non T aleloak babeseke ($OR= 0,64$) tendentzia erakutsi zuen. rs35770269 SNPa mir-449c miRNAREN *seed* gunean kokatuta dago eta SNPa hor egotean bere itua geneen lotura alda dezake. Izan ere, *in*

silico analisisiek rs35770269-T aleloak (arriskua aregotzen zuena) mir-449c bigarren mailako egitura aldatzen du (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/miRNASNP2/>), haien itu geneen osagarritasuna aldatuz. Mir-449c miRNA kluster kontserbakorrean kokatuta dago eta bere *seed* sekuentziarekin duen homología dela eta mir-34 miRNA familiakidea (213). Mir-34 familia osteosarkomagenesi prozesuetan parte hartzen duela jakina da, bere kide guztiek osteoblastoen ezberdintzapena sustatzen dutelako hezuraren osaketa prozesuan (105, 214). Orain arte, mir-34ren familiaren mir-SNPen eta OSren arriskuaren artean asoziazio adierazgarriak topatu dituzte. Zehazki, rs4938723- T, pri-mir-34b/c gune promotorean kokatuta dago eta rs72631823-A, pre-mir-34a miRNA kokatua dagoena, OS arriskua emendatzen zuten populazio asiaticoan (109, 110). Azken artikulua honetan, rs72631823-A aleloak mir-34a-ren adierazpenaren murrizten du OS lerro zelularretan c-MET itu genearen lotura aldatuz eta zelulen proliferazio zelularra sustatuz. Gaur egun jakina da familia bereko miRNAs itu gene berak erregulatzen dituztela beraz, mir-34 eta mir-499 familiakideak gene berak erregulatzea espero da. Zentzu honetan, rs35770269-T aleloa mir-449 miRNA mir-34 miRNAren modu berean joka dezake c-MET genearekin lotura aldatuz.

Populazio esloveniarrean behatu genuen emaitzik interesgarriena mir-5189 miRNA kokatuta dauden 2 SNP (rs35613341 eta rs56292801) OSren arriskuarekin asoziatuak topatu genuen. rs35613341 SNPak gainera, Bonferroniaren zuzenketa gainditu zuen ($p=0,0001$). Bi SNPetan OS kasuen heterozigotoen jaitsiera nabarmena antzeman genuen. Heterozigositatearen galerak miRNA kokatuta zegoen gunean delezioa egon zitezela adierazten zuen. DGV (*Database of Genomic Variation*) datubasea erabiliz benetan populazio orokorrean maiztasun handian delezioak agertzen diren gunea zela baieztatu genuen. Lehenengo aldiz, mir-5189 miRNAko polimorfismoak OSren arriskuarekin asoziatuak aurkitu genuen. Asoziazio hau populazio esloveniarrean bakarrik gertatzen zen eta hori dela eta, populazio horren berezko ezaugarria izan daitezkeela uste dugu.

mir-3620 miRNA kokatuta dagoen rs2070960 SNPa ere OSren suszeptibilitatearekin asoziatuak topatu genuen, kasu honetan TT babeseko genotipoa izanik. Orain arte, ez dira miRNA honen itu geneak zehaztu. Hala eta guztiz ere, miRNA hau *ADP-ribosylation factor 1 (ARF1)* genearen 2. Introian kokatuta dago. Gene hau proliferazio zelularrean paper garrantzitsua jokatzen duen GTPasa kodetzen du (215). *ARF1* GTPasak proliferazio honen erregulazio pRB/E2F1 jardueraren bidez kontrolatzen du bularreko minbiziaren lerro zelularrean (216). Beraz, rs2070960 *ARF1* genearean adierazpena modulatu dezake eta OSn proliferazio zelularren prozesuan alterazioak sortuz. Izan ere, *in silico* analisisien bitartez T

aleloak CP2 eta P (F-SNP datubasetik) lotura gune berriak sortzen dituela eta horrek genearen adierazpenean eragin dezake.

Populazio esloveniarrean adierazgarria izan zen hurrengo polimorfismoa rs2273626 izan zen, mir-4707 miRNAk kokatuta. Polimorfismo honen AC+CC genotipoak OS arriskua emendatzen zuen (OR=5,01). Orain arte, ez dakizkigu ze gene erregulatzen ditu mir-4707 miRNAk. Hala eta guztiz ere, miRNA hau *HAUS augmin-like complex, subunit 4 (HAUS4)* genearen 5'UTR gunean kokatuta dago. Gene hau zentrosomaren augmina deitzen den konplexuaren azpiunitatea kodetzen du, zentrosomaren multzokatzea gertatzeko beharrezkoa dena. Zehazki, azpiunitate hau ardatz mitotikoan kokatzen da eta hori dela eta, mihiztadura mitotikoan eta zentrosomaren egongortasunean parte hartzen du zatiketa zelularrean (217). OSn, AC+CC genotipoak SNP honetan *HAUS4* genearen adierazpen maila alda dezake OSn zatiketa zelularra aldatuz.

rs9877402 SNPa ere OSren arriskuarekin asoziatu zen. Polimorfismo hau mir-5682 pre-miRNAk kokatuta dago, eta *a priori* miRNA helduaren adierazpena alda dezake. Hala ere, momentuz ez dira bere iturriak ezagutzen. Mir-5682 *syntaxin binding protein 5-like (STXBP5L)* genearen 4. Introian kokatuta dago eta II. tomosina kodetzen du exozitosian parte hartzen duen mintzarteko proteina kodetzen du (217). MiRNAk besikula edo exosometan zelulatik at garraiatzen direla jakina da (218, 219), beraz, tomosinen familian gertatzen diren alterazioak exosomen bidezko miRNA garraioan eragin dezakete. Ideia hau bultzatuz, OS metastasikoan tomosinen familiako genetan adierazpen aldaketak behatu dira (220) eta honek miRNAen exozitosian eragin dezake. Hori dela eta, rs9877402 SNPa *STXBP5L* genearen adierazpena alda dezake exozitosiaren erregulazioa modifikatuz.

rs4674470 SNPa mir-4268 miRNAk, rs6726779 SNPa mir-4431 miRNAk eta rs243080 SNPa mir-4432 miRNAk ere asoziazio adierazgarriak erakutsi zituzten populazio esloveniarrean. Hala ere, ezin izan genuen asoziazio hau OSrekin duen erlazioa azaldu.

Azkenik, rs3746444 SNPa pre-mir-499an ere OSren arriskuarekin asoziatu topatu genuen (soilik populazio esloveniarrean). Kasu honetan SNP honen G aleloa arriskuaren murrizpenarekin asoziatu zen (OR=6,71). Rs3746444 literaturan gehien aztertutako polimorfismoa da. Izan ere, minbizi anitzen sorrerarekin asoziatu dute (221-225). Horrez gain, gure emaitzekin bat, bi meta-analisik G aleloa zenbait minbizien sorreraren arriskua murrizten

dute populazio kaukasikoan (226, 227). Hala ere, lehenengo aldia da SNP hau OS arriskuarekin asoziatzen dela. Rs3746444 mir-499-5p-ren pre-miRNAn kokatuta eta mir-499-3p-ren *seed* gunean. MiRNA hauen itu gene potentzialak *RECQL* eta *RB1* geneak dira, hurrenez hurren (186). Gene hauek genomaren DNA konponketan eta egonkortasunean inplikaturik daude. Lehen komentatu dugun moduan, *RB1* geneak alterazioak erakusten ditu OS esporadikoen %35ean eta *RECQL* genea ostera, OS izateko arriskua areagotuta duten hiru sindromeren (Sindromes RTS, Werner eta Bloom) jatorriaren erantzulea da. Zehazki populazio esloveniarrean, G aleloaren babesak mir-499 miRNaren gain-adierazpena sor dezake, eta honek erregulatzen dituen geneen adierazpena murriztu dezake. Esan bezala, gene hauen inaktibazioa, hain adierazpena murrizketa dela eta, OSren arriskuan inplikaturik daudela ematen du.

Populazio biak batera aztertzerakoan 12 SNP adierazgarri topatu genituen, haietatik bostek espainiako populazioan ere asoziatuak ikusi genituen, lau SNP populazio esloveniarrean ere asoziatuak eta hiru SNP aurkikuntza berria izan ziren.

Hiru SNP horietan arreta jarritz (rs2910164, rs4112253 eta rs67042258), bi populazioetan arrisku tendentzia gehigarria behatu genuen, hau da, nahiz eta asoziazio balio ez adierazgarriak izan populazioak indibidualki analizatuz, biak arrisku genotipo berak zituzten, beraz, lagin tamainua handituz botere estatistikoa handitu genuen asozio adierazgarriak topatuz. Emaitza hauen arabera hiru polimorfismo hauek populazio mailan OSren suszeptibilitate-markatzaileak izan daitezke.

Hiru SNP hauetatik, emaitzik interesgarriena rs2910164 SNPa mir-146a miRNAn topatu genuen non CG+CC genotipoan OR=0,58, babeseko joera behatu genuen, eta hortaz GG genotipoa arriskua adierazten zuen. Polimorfismo hau sarritan aztertu dute eta baita minbizi askorekin asoziatu eta hori dela eta, zenbait meta-analisi plazaratu dira kartzinoma hepatozelularrean (228), eta minbizi gastrikoan (229, 230), asoziazioak topatuz. Polimorfismo hau OSan LV H-en taldeak aztertu zuten asoziaziorik topatu ezinik ($p=0,1$) (110). Emaitza hauek izan arren, haien emaitzak gure emaitzekin bat zetozten (OR=0,69; IC95%= 0,43-1,12; $p=0,13$ versus OR=0,68; IC95%= 0,42-1,11; $p=0,11$; eredu alelikoa). Rs2910164 SNPa miR-146 miRNaren 3p harizpian kokatuta dago eta Ctik Grako aldaketa sortzen du; miRNaren prozesamenduan alterazioak gausatuz. Kasu honetan, C aleloa mir-146 ekoizpenaren murrizketa dakar (231), eta horrek itu genekin lotzeko probabilitatea murrizten du. miRNA honen itu genetako bat *TNF receptor associated factor 6 (TRAF6)* genea da, OS lerro zelularren proliferazioa, apoptosia eta inbazio ahalmen erregulatuak murrizten duela behatu (232).

Ondorioz, rs2910164 polimorfismoa mir-146 miRNAn OS ren patogenezian paper garrantzitsua jokatzen duela postulatzea logikoa da.

Rs4112253 SNPa mir-4752 miRNAn ere emaitza interesgarria topatu genuen. Nahiz eta itu gene ezagunik ez izan, *leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A member 6 (LILRA6)* genearen 1. Introian kokatuta dago 19q13.4 gunean. Gene hau leukozitoen hartzaileen gene-klusterreko kidea izanik CNV eta CNA (*copy number alteration* edo alterazioak kopia kopuruan) anitz aurkezten dituen zonaldea da (233). Zehazki OSn, CNAk (anplifikazioak) deskribatu dira gune honetan (234-236).

Azkenik, hirugarren polimorfismo berria mir-6128 miRNAn dagoen rs67042258 SNPa izan zen. Oraindik ez zaio itu generik ezagutzen. Halere, miRNA hau *olfactory receptor, family 9, subfamily G, member 4 (OR9G4)* genearen 5'UTR eskualdetik transkribatzen da. Orain arte, gene honen papera ezjakina da OSn. Alabaina, beste tumoretan *OR9G4* genearen familiaren gain-adierazpena behatu da *OR9G4* (237, 238), prostata minbiziaren proliferazio zelularren *in vitro* inhibizioa eraginez (239, 240).

OSren suszeptibilitatean pre-miRNA SNPen azterketa hain sakona egiten den lehenengo aldia da. Azterketa honetan, 26 SNP 25 miRNA genetan OSren suszeptibilitatearekin asoziatuak topatu genituen. Gure emaitzik interesgarriena 14q32 miRNA-klusterrean topatutako asoziazioa izan zen. Bertan, 4 SNP 4 miRNAek asoziazio adierazten zuten populazio espainiarrean. miRNA kluster honetako miRNAk *MYC* genea erregulatzen dute OSn. Hori dela eta, OSren suszeptibilitatearen *hotspot*-a izan daiteke. Esloveniako populazioan, 16q24 gune kromosomikoan, lehenengo aldiz OSren suszeptibilitatearekin asoziatuak, delezioa topatu genuen. Horrez gain, literaturan beste minbiziekin asoziatuak bi miRNA (mir-499 eta mir-146a) aurkitu genituen. Bi populazioak batera aztertu genituen botere estatistikoa emendatu genuen eta hiru arrisku-markatzaile berri topatu genituen: mir-146a, mir-4752 eta mir-6128. Emaitza hauen arabera, miRNAk 3 polimorfismo hauek OSren suszeptibilitatearen markatzaile moduan joka dezakete populazio orokorrean.

AZKEN HAUSNARKETAK

AZKEN HAUSNARKETAK

1. *MDM2* genearen rs1690916 eta rs2279744 polimorfismoak eta OSren suszeptibilitatean duten erlazioa aztertu eta gero, ez genuen haien arteko asoziaziorik aurkitu. Hortaz, bariante hauek ez litzateke OSren suszeptibilitatearen markatzaileak kotsideratu behar.
2. *CTLA4* genearen rs231775 polimorfismoaren kasuan literaturan behatutako emaitzeak baieztatu genituen. Hortaz, *CTLA4* genearen rs231775 polimorfismoa OSren suszeptibilitatearen markatzailea izan daiteke.
3. Gure emaitzek RISC konplexuak minbizian duen garrantzia azpimarratzen dute. Izan ere, hiru aldaera genetiko konplexu honen hiru genetan (rs11866002 genes *CNOT1*, rs3812265 en el gen *CNOT4* y rs3823994 en el gen *SND1*) OSren suszeptibilitatearekin asoziatu topatu genituen.
4. 14q32 gune kromosomikoa OSren suszeptibilitatearen *hostspot*-a izan daiteke. Gune honetan *MYC* onkogenea erregulatzen duten miRNA klusterrean dauden aldaera genetikoek bere funtzioa alda baitezakete.

Ondorioz, gure emaitzek gune ez kodetzailatako aldaera genetikoak OS pediatrikoaren suszeptibilitatean duten garrantzia azpimarratzen dute.

REFERENCIAS

ERREFERENTZIAK

1. Kent PM, Trafton LW. Clinical presentation of bone tumors in children and young adults. *Curr Probl Cancer*. 2013;37(4):167-71.
2. Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, World Health Organization., International Agency for Research on Cancer. *Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone*. Lyon: IARC Press; 2002. 427 p. p.
3. Rosenberg AE, Cleton-Jansen AM, de Pinieux G, Deyrup AT, Hauben E, Squire J. The World Health Organization classification of tumors of soft tissue and bone tumors. Fletcher CDM, Hogendoorn PCW, Mertens F, Bridge J, editors 2013.
4. Parkin DM, Stiller CA, Nectoux J. International variations in the incidence of childhood bone tumours. *Int J Cancer*. 1993;53(3):371-6.
5. Mirabello L, Pfeiffer R, Murphy G, Daw NC, Patiño-Garcia A, Troisi RJ, et al. Height at diagnosis and birth-weight as risk factors for osteosarcoma. *Cancer Causes Control*. 2011;22(6):899-908.
6. Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer*. 2009;115(7):1531-43.
7. Control UfIC. Review of Cancer Medicines on the WHO List of Essential Medicines- Osteosarcoma. 2014.
8. Geng S, Zhang X, Chen J, Liu X, Zhang H, Xu X, et al. The tumor suppressor role of miR-124 in osteosarcoma. *PLoS One*. 2014;9(6):e91566.
9. Miller I, Kent PM, Finney J. The pathophysiology of primary bone tumors in young adults and children. *Curr Probl Cancer*. 2013;37(4):172-80.
10. Pasic I, Shlien A, Durbin AD, Stavropoulos DJ, Baskin B, Ray PN, et al. Recurrent focal copy-number changes and loss of heterozygosity implicate two noncoding RNAs and one tumor suppressor gene at chromosome 3q13.31 in osteosarcoma. *Cancer Res*. 2010;70(1):160-71.
11. Sugawara M, Kato N, Tsuchiya T, Motoyama T. RUNX2 expression in developing human bones and various bone tumors. *Pathol Int*. 2011;61(10):565-71.
12. Yang J, Yang D, Sun Y, Sun B, Wang G, Trent JC, et al. Genetic amplification of the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway genes, including VEGFA, in human osteosarcoma. *Cancer*. 2011;117(21):4925-38.
13. Yen CC, Chen WM, Chen TH, Chen WY, Chen PC, Chiou HJ, et al. Identification of chromosomal aberrations associated with disease progression and a novel 3q13.31 deletion involving LSAMP gene in osteosarcoma. *Int J Oncol*. 2009;35(4):775-88.
14. Kanamori M, Sano A, Yasuda T, Hori T, Suzuki K. Array-based comparative genomic hybridization for genomic-wide screening of DNA copy number alterations in aggressive bone tumors. *J Exp Clin Cancer Res*. 2012;31:100.
15. Both J, Wu T, Bras J, Schaap GR, Baas F, Hulsebos TJ. Identification of novel candidate oncogenes in chromosome region 17p11.2-p12 in human osteosarcoma. *PLoS One*. 2012;7(1):e30907.
16. Chen X, Bahrami A, Pappo A, Easton J, Dalton J, Hedlund E, et al. Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma. *Cell Rep*. 2014;7(1):104-12.
17. Hansen MF. Molecular genetic considerations in osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res*. 1991(270):237-46.
18. .
19. Yang J, Zhang W. New molecular insights into osteosarcoma targeted therapy. *Curr Opin Oncol*. 2013;25(4):398-406.
20. Wei G, Lonardo F, Ueda T, Kim T, Huvos AG, Healey JH, et al. CDK4 gene amplification in osteosarcoma: reciprocal relationship with INK4A gene alterations and mapping of 12q13 amplicons. *Int J Cancer*. 1999;80(2):199-204.

21. Lockwood WW, Stack D, Morris T, Grehan D, O'Keane C, Stewart GL, et al. Cyclin E1 is amplified and overexpressed in osteosarcoma. *J Mol Diagn.* 2011;13(3):289-96.
22. Zhang CZ, Leibowitz ML, Pellman D. Chromothripsis and beyond: rapid genome evolution from complex chromosomal rearrangements. *Genes Dev.* 2013;27(23):2513-30.
23. Reimann E, Köks S, Ho XD, Maasalu K, Märtson A. Whole exome sequencing of a single osteosarcoma case-integrative analysis with whole transcriptome RNA-seq data. *Hum Genomics.* 2014;8(1):20.
24. Mohseny AB, Hogendoorn PC. Concise review: mesenchymal tumors: when stem cells go mad. *Stem Cells.* 2011;29(3):397-403.
25. Tang N, Song WX, Luo J, Haydon RC, He TC. Osteosarcoma development and stem cell differentiation. *Clin Orthop Relat Res.* 2008;466(9):2114-30.
26. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature.* 2011;469(7330):314-22.
27. Mutsaers AJ, Walkley CR. Cells of origin in osteosarcoma: mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? *Bone.* 2014;62:56-63.
28. Savage SA, Mirabello L. Using epidemiology and genomics to understand osteosarcoma etiology. *Sarcoma.* 2011;2011:548151.
29. Spector LG, Pankratz N, Marcotte EL. Genetic and nongenetic risk factors for childhood cancer. *Pediatr Clin North Am.* 2015;62(1):11-25.
30. Knappskog S, Lønning PE. MDM2 promoter SNP285 and SNP309; phylogeny and impact on cancer risk. *Oncotarget.* 2011;2(3):251-8.
31. Knappskog S, Bjørnslett M, Myklebust LM, Huijts PE, Vreeswijk MP, Edvardsen H, et al. The MDM2 promoter SNP285C/309G haplotype diminishes Sp1 transcription factor binding and reduces risk for breast and ovarian cancer in Caucasians. *Cancer Cell.* 2011;19(2):273-82.
32. Momand J, Wu HH, Dasgupta G. MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene.* 2000;242(1-2):15-29.
33. Toffoli G, Biason P, Russo A, De Mattia E, Cecchin E, Hattinger CM, et al. Effect of TP53 Arg72Pro and MDM2 SNP309 polymorphisms on the risk of high-grade osteosarcoma development and survival. *Clin Cancer Res.* 2009;15(10):3550-6.
34. Ito M, Barys L, O'Reilly T, Young S, Gorbacheva B, Monahan J, et al. Comprehensive mapping of p53 pathway alterations reveals an apparent role for both SNP309 and MDM2 amplification in sarcomagenesis. *Clin Cancer Res.* 2011;17(3):416-26.
35. Mirabello L, Yu K, Berndt SI, Burdett L, Wang Z, Chowdhury S, et al. A comprehensive candidate gene approach identifies genetic variation associated with osteosarcoma. *BMC Cancer.* 2011;11:209.
36. Naumov VA, Generozov EV, Solovyov YN, Aliev MD, Kushlinsky NE. Association of FGFR3 and MDM2 gene nucleotide polymorphisms with bone tumors. *Bull Exp Biol Med.* 2012;153(6):869-73.
37. Scalapino KJ, Daikh DI. CTLA-4: a key regulatory point in the control of autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2008;223:143-55.
38. Yuan J, Ginsberg B, Page D, Li Y, Rasalan T, Gallardo HF, et al. CTLA-4 blockade increases antigen-specific CD8(+) T cells in prevaccinated patients with melanoma: three cases. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(8):1137-46.
39. Lutzky J. Checkpoint inhibitors in the treatment of cutaneous malignant melanoma. *Chin Clin Oncol.* 2014;3(3):30.
40. Ligers A, Teleshova N, Masterman T, Huang WX, Hillert J. CTLA-4 gene expression is influenced by promoter and exon 1 polymorphisms. *Genes Immun.* 2001;2(3):145-52.
41. Erfani N, Razmkhah M, Talei AR, Pezeshki AM, Doroudchi M, Monabati A, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 promoter variants in breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006;165(2):114-20.
42. Hadinia A, Hossieni SV, Erfani N, Saberi-Firozi M, Fattahi MJ, Ghaderi A. CTLA-4 gene promoter and exon 1 polymorphisms in Iranian patients with gastric and colorectal cancers. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22(12):2283-7.

43. Sun T, Zhou Y, Yang M, Hu Z, Tan W, Han X, et al. Functional genetic variations in cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and susceptibility to multiple types of cancer. *Cancer Res.* 2008;68(17):7025-34.
44. Musselman JR, Bergemann TL, Ross JA, Sklar C, Silverstein KA, Langer EK, et al. Case-parent analysis of variation in pubertal hormone genes and pediatric osteosarcoma: a Children's Oncology Group (COG) study. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2012;3(4):286-93.
45. Savage SA, Woodson K, Walk E, Modi W, Liao J, Douglass C, et al. Analysis of genes critical for growth regulation identifies Insulin-like Growth Factor 2 Receptor variations with possible functional significance as risk factors for osteosarcoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(8):1667-74.
46. Xu S, Yang S, Sun G, Huang W, Zhang Y. Transforming growth factor-beta polymorphisms and serum level in the development of osteosarcoma. *DNA Cell Biol.* 2014;33(11):802-6.
47. Hu YS, Pan Y, Li WH, Zhang Y, Li J, Ma BA. Int7G24A variant of transforming growth factor-beta receptor 1 is associated with osteosarcoma susceptibility in a Chinese population. *Med Oncol.* 2011;28(2):622-5.
48. He M, Wang Z, Zhao J, Chen Y, Wu Y. COL1A1 polymorphism is associated with risks of osteosarcoma susceptibility and death. *Tumour Biol.* 2014;35(2):1297-305.
49. Ruza E, Sotillo E, Sierrasesúмага L, Azcona C, Patiño-García A. Analysis of polymorphisms of the vitamin D receptor, estrogen receptor, and collagen Ialpha1 genes and their relationship with height in children with bone cancer. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003;25(10):780-6.
50. Mirabello L, Richards EG, Duong LM, Yu K, Wang Z, Cawthon R, et al. Telomere length and variation in telomere biology genes in individuals with osteosarcoma. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2011;2(1):19-29.
51. Nishijo K, Nakayama T, Aoyama T, Okamoto T, Ishibe T, Yasura K, et al. Mutation analysis of the RECQL4 gene in sporadic osteosarcomas. *Int J Cancer.* 2004;111(3):367-72.
52. Goricar K, Kovac V, Jazbec J, Lamovec J, Dolzan V. HOMOLOGOUS RECOMBINATION REPAIR POLYMORPHISMS AND THE RISK FOR OSTEOSARCOMA. *J Med Biochem.* 2014;33:1-7.
53. Savage SA, Burdett L, Troisi R, Douglass C, Hoover RN, Chanock SJ, et al. Germ-line genetic variation of TP53 in osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2007;49(1):28-33.
54. He J, Wang J, Wang D, Dai S, Yv T, Chen P, et al. Association analysis between genetic variants of MDM2 gene and osteosarcoma susceptibility in Chinese. *Endocr J.* 2013;60(11):1215-20.
55. He J, Wang J, Wang D, Dai S, Yv T, Chen P, et al. Association between CTLA-4 genetic polymorphisms and susceptibility to osteosarcoma in Chinese Han population. *Endocrine.* 2014;45(2):325-30.
56. Liu Y, He Z, Feng D, Shi G, Gao R, Wu X, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 polymorphisms and susceptibility to osteosarcoma. *DNA Cell Biol.* 2011;30(12):1051-5.
57. Wang W, Wang J, Song H, Liu J, Song B, Cao X. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 +49G/A polymorphism is associated with increased risk of osteosarcoma. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2011;15(7-8):503-6.
58. Savage SA, Mirabello L, Wang Z, Gastier-Foster JM, Gorlick R, Khanna C, et al. Genome-wide association study identifies two susceptibility loci for osteosarcoma. *Nat Genet.* 2013;45(7):799-803.
59. Skerry TM. The role of glutamate in the regulation of bone mass and architecture. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2008;8(2):166-73.
60. Cheetham SW, Gruhl F, Mattick JS, Dinger ME. Long noncoding RNAs and the genetics of cancer. *Br J Cancer.* 2013;108(12):2419-25.

61. McPherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A, Wallis J, et al. A physical map of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):934-41.
62. Consortium IHGS. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431(7011):931-45.
63. Sana J, Faltejskova P, Svoboda M, Slaby O. Novel classes of non-coding RNAs and cancer. *J Transl Med*. 2012;10:103.
64. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004;10(2):185-91.
65. Kim VN. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol*. 2004;14(4):156-9.
66. Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 2001;293(5531):834-8.
67. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*. 2001;15(20):2654-9.
68. Merritt WM, Bar-Eli M, Sood AK. The dicey role of Dicer: implications for RNAi therapy. *Cancer Res*. 2010;70(7):2571-4.
69. Song JJ, Liu J, Tolia NH, Schneidman J, Smith SK, Martienssen RA, et al. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol*. 2003;10(12):1026-32.
70. Inada T, Makino S. Novel roles of the multi-functional CCR4-NOT complex in post-transcriptional regulation. *Front Genet*. 2014;5:135.
71. Li S, Wang L, Fu B, Berman MA, Diallo A, Dorf ME. TRIM65 regulates microRNA activity by ubiquitination of TNRC6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(19):6970-5.
72. .
73. Gregory RI, Chendrimada TP, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis: isolation and characterization of the microprocessor complex. *Methods Mol Biol*. 2006;342:33-47.
74. Varol N, Konac E, Gurocak OS, Sozen S. The realm of microRNAs in cancers. *Mol Biol Rep*. 2011;38(2):1079-89.
75. Guo L, Zhao Y, Zhang H, Yang S, Chen F. Integrated evolutionary analysis of human miRNA gene clusters and families implicates evolutionary relationships. *Gene*. 2014;534(1):24-32.
76. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15-20.
77. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19(1):92-105.
78. Sun G, Yan J, Noltner K, Feng J, Li H, Sarkis DA, et al. SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA*. 2009;15(9):1640-51.
79. Mishra PJ, Bertino JR. MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics*. 2009;10(3):399-416.
80. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet*. 2007;39(5):673-7.
81. Huang JT, Wang J, Srivastava V, Sen S, Liu SM. MicroRNA Machinery Genes as Novel Biomarkers for Cancer. *Front Oncol*. 2014;4:113.
82. Melo SA, Esteller M. Disruption of microRNA nuclear transport in human cancer. *Semin Cancer Biol*. 2014;27C:46-51.
83. Melo SA, Roper S, Moutinho C, Aaltonen LA, Yamamoto H, Calin GA, et al. A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nat Genet*. 2009;41(3):365-70.

84. Iliou MS, da Silva-Diz V, Carmona FJ, Ramalho-Carvalho J, Heyn H, Villanueva A, et al. Impaired DICER1 function promotes stemness and metastasis in colon cancer. *Oncogene*. 2013.
85. Wu S, Yu W, Qu X, Wang R, Xu J, Zhang Q, et al. Argonaute 2 promotes myeloma angiogenesis via microRNA dysregulation. *J Hematol Oncol*. 2014;7(1):40.
86. Rotunno M, Zhao Y, Bergen AW, Koshiol J, Burdette L, Rubagotti M, et al. Inherited polymorphisms in the RNA-mediated interference machinery affect microRNA expression and lung cancer survival. *Br J Cancer*. 2010;103(12):1870-4.
87. Gutierrez-Camino A, Lopez-Lopez E, Martin-Guerrero I, Piñan MA, Garcia-Miguel P, Sanchez-Toledo J, et al. Noncoding RNA-related polymorphisms in pediatric acute lymphoblastic leukemia susceptibility. *Pediatr Res*. 2014;75(6):767-73.
88. Liu S, An J, Lin J, Liu Y, Bao L, Zhang W, et al. Single nucleotide polymorphisms of microRNA processing machinery genes and outcome of hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2014;9(3):e92791.
89. .
90. Kim JS, Choi YY, Jin G, Kang HG, Choi JE, Jeon HS, et al. Association of a common AGO1 variant with lung cancer risk: a two-stage case-control study. *Mol Carcinog*. 2010;49(10):913-21.
91. Jiang Y, Chen J, Wu J, Hu Z, Qin Z, Liu X, et al. Evaluation of genetic variants in microRNA biosynthesis genes and risk of breast cancer in Chinese women. *Int J Cancer*. 2013;133(9):2216-24.
92. . !!! INVALID CITATION !!!
93. Yang H, Dinney CP, Ye Y, Zhu Y, Grossman HB, Wu X. Evaluation of genetic variants in microRNA-related genes and risk of bladder cancer. *Cancer Res*. 2008;68(7):2530-7.
94. Horikawa Y, Wood CG, Yang H, Zhao H, Ye Y, Gu J, et al. Single nucleotide polymorphisms of microRNA machinery genes modify the risk of renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14(23):7956-62.
95. Liu J, Wei M, He Y, Liao B, Liao G, Li H, et al. Genetic variants in the microRNA machinery gene GEMIN4 are associated with risk of prostate cancer: a case-control study of the Chinese Han population. *DNA Cell Biol*. 2012;31(7):1296-302.
96. Liang D, Meyer L, Chang DW, Lin J, Pu X, Ye Y, et al. Genetic variants in MicroRNA biosynthesis pathways and binding sites modify ovarian cancer risk, survival, and treatment response. *Cancer Res*. 2010;70(23):9765-76.
97. Palanichamy JK, Rao DS. miRNA dysregulation in cancer: towards a mechanistic understanding. *Front Genet*. 2014;5:54.
98. Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:287-314.
99. Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, Bushell M. microRNAs in cancer management. *Lancet Oncol*. 2012;13(6):e249-58.
100. Law PT, Wong N. Emerging roles of microRNA in the intracellular signaling networks of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26(3):437-49.
101. Maire G, Martin JW, Yoshimoto M, Chilton-MacNeill S, Zielenska M, Squire JA. Analysis of miRNA-gene expression-genomic profiles reveals complex mechanisms of microRNA deregulation in osteosarcoma. *Cancer Genet*. 2011;204(3):138-46.
102. Jones KB, Salah Z, Del Mare S, Galasso M, Gaudio E, Nuovo GJ, et al. miRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma. *Cancer Res*. 2012;72(7):1865-77.
103. Kobayashi E, Hornicek FJ, Duan Z. MicroRNA Involvement in Osteosarcoma. *Sarcoma*. 2012;2012:359739.
104. van Wijnen AJ, van de Peppel J, van Leeuwen JP, Lian JB, Stein GS, Westendorf JJ, et al. MicroRNA functions in osteogenesis and dysfunctions in osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep*. 2013;11(2):72-82.

105. Bae Y, Yang T, Zeng HC, Campeau PM, Chen Y, Bertin T, et al. miRNA-34c regulates Notch signaling during bone development. *Hum Mol Genet.* 2012;21(13):2991-3000.
106. Kelly AD, Haibe-Kains B, Janeway KA, Hill KE, Howe E, Goldsmith J, et al. MicroRNA paraffin-based studies in osteosarcoma reveal reproducible independent prognostic profiles at 14q32. *Genome Med.* 2013;5(1):2.
107. Xia L, Ren Y, Fang X, Yin Z, Li X, Wu W, et al. Prognostic role of common microRNA polymorphisms in cancers: evidence from a meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9(10):e106799.
108. Srivastava K, Srivastava A. Comprehensive review of genetic association studies and meta-analyses on miRNA polymorphisms and cancer risk. *PLoS One.* 2012;7(11):e50966.
109. Tian Q, Jia J, Ling S, Liu Y, Yang S, Shao Z. A causal role for circulating miR-34b in osteosarcoma. *Eur J Surg Oncol.* 2014;40(1):67-72.
110. Lv H, Pei J, Liu H, Wang H, Liu J. A polymorphism site in the pre-miR-34a coding region reduces miR-34a expression and promotes osteosarcoma cell proliferation and migration. *Mol Med Rep.* 2014;10(6):2912-6.
111. Gu F, Pfeiffer RM, Bhattacharjee S, Han SS, Taylor PR, Berndt S, et al. Common genetic variants in the 9p21 region and their associations with multiple tumours. *Br J Cancer.* 2013;108(6):1378-86.
112. He ML, Wu Y, Zhao JM, Wang Z, Chen YB. PIK3CA and AKT gene polymorphisms in susceptibility to osteosarcoma in a Chinese population. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(9):5117-22.
113. Zhao J, Xu H, He M, Wang Z, Wu Y. Rho GTPase-activating protein 35 rs1052667 polymorphism and osteosarcoma risk and prognosis. *Biomed Res Int.* 2014;2014:396947.
114. Mirabello L, Berndt SI, Seratti GF, Burdett L, Yeager M, Chowdhury S, et al. Genetic variation at chromosome 8q24 in osteosarcoma cases and controls. *Carcinogenesis.* 2010;31(8):1400-4.
115. Wang W, Song H, Liu J, Song B, Cao X. CD86 + 1057G/A polymorphism and susceptibility to osteosarcoma. *DNA Cell Biol.* 2011;30(11):925-9.
116. Liu S, Geng P, Cai X, Wang J. Comprehensive evaluation of the cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 gene polymorphisms in risk of bone sarcoma. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2014;18(8):574-9.
117. Bion N, Hattinger CM, Innocenti F, Talamini R, Alberghini M, Scotlandi K, et al. Nucleotide excision repair gene variants and association with survival in osteosarcoma patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Pharmacogenomics J.* 2012;12(6):476-83.
118. Koshkina NV, Kleinerman ES, Li G, Zhao CC, Wei Q, Sturgis EM. Exploratory analysis of Fas gene polymorphisms in pediatric osteosarcoma patients. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2007;29(12):815-21.
119. Jiang C, Chen H, Shao L, Dong Y. GRM4 gene polymorphism is associated with susceptibility and prognosis of osteosarcoma in a Chinese Han population. *Med Oncol.* 2014;31(7):50.
120. Lu XF, Yang WL, Wan ZH, Li J, Bi ZG. Glutathione S-transferase polymorphisms and bone tumor risk in China. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12(12):3357-60.
121. Oliveira ID, Petrilli AS, Tavela MH, Zago MA, de Toledo SR. TNF-alpha, TNF-beta, IL-6, IL-10, PECAM-1 and the MPO inflammatory gene polymorphisms in osteosarcoma. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2007;29(5):293-7.
122. Wang J, Nong L, Wei Y, Qin S, Zhou Y, Tang Y. Association of interleukin-12 polymorphisms and serum IL-12p40 levels with osteosarcoma risk. *DNA Cell Biol.* 2013;32(10):605-10.
123. He Y, Liang X, Meng C, Shao Z, Gao Y, Wu Q, et al. Genetic polymorphisms of interleukin-1 beta and osteosarcoma risk. *Int Orthop.* 2014;38(8):1671-6.
124. Tang YJ, Wang JL, Nong LG, Lan CG, Zha ZG, Liao PH. Associations of IL-27 polymorphisms and serum IL-27p28 levels with osteosarcoma risk. *Medicine (Baltimore).* 2014;93(10):e56.

125. Yang W, He M, Zhao J, Wang Z. Association of ITGA3 gene polymorphisms with susceptibility and clinicopathological characteristics of osteosarcoma. *Med Oncol*. 2014;31(2):826.
126. Liu Y, Lv B, He Z, Zhou Y, Han C, Shi G, et al. Lysyl oxidase polymorphisms and susceptibility to osteosarcoma. *PLoS One*. 2012;7(7):e41610.
127. Ozger H, Kilicoglu O, Yilmaz H, Ergen HA, Yaylim I, Zeybek U, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism in osteosarcoma and chondrosarcoma patients. *Folia Biol (Praha)*. 2008;54(2):53-7.
128. Ergen A, Kilicoglu O, Ozger H, Agachan B, Isbir T. Paraoxonase 1 192 and 55 polymorphisms in osteosarcoma. *Mol Biol Rep*. 2011;38(6):4181-4.
129. Hu YS, Pan Y, Li WH, Zhang Y, Li J, Ma BA. Association between TGFBR1*6A and osteosarcoma: a Chinese case-control study. *BMC Cancer*. 2010;10:169.
130. Patio-Garcia A, Sotillo-Pieiro E, Modesto C, Sierrases-Maga L. Analysis of the human tumour necrosis factor-alpha (TNFalpha) gene promoter polymorphisms in children with bone cancer. *J Med Genet*. 2000;37(10):789-92.
131. Wang Z, Wen P, Luo X, Fang X, Wang Q, Ma F, et al. Association of the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene single-nucleotide polymorphisms with osteosarcoma susceptibility in a Chinese population. *Tumour Biol*. 2014;35(4):3605-10.
132. Guo J, Jin M, Zhang M, Chen K. A genetic variant in miR-196a2 increased digestive system cancer risks: a meta-analysis of 15 case-control studies. *PLoS One*. 2012;7(1):e30585.
133. Li K, Tie H, Hu N, Chen H, Yin X, Peng C, et al. Association of two polymorphisms rs2910164 in miRNA-146a and rs3746444 in miRNA-499 with rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Hum Immunol*. 2014;75(7):602-8.
134. MANTEL N, HAENSZEL W. Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease. *J Natl Cancer Inst*. 1959;22(4):719-48.
135. Dickersin K, Min YI. Publication bias: the problem that won't go away. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;703:135-46; discussion 46-8.
136. Easterbrook PJ, Berlin JA, Gopalan R, Matthews DR. Publication bias in clinical research. *Lancet*. 1991;337(8746):867-72.
137. Simes RJ. Confronting publication bias: a cohort design for meta-analysis. *Stat Med*. 1987;6(1):11-29.
138. Egger M, Smith GD. Misleading meta-analysis. *BMJ*. 1995;310(6982):752-4.
139. Breving K, Esquela-Kerscher A. The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(8):1316-29.
140. Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal*. 1999;14(5-6):143-9.
141. Slaby O, Bienertova-Vasku J, Svoboda M, Vyzula R. Genetic polymorphisms and microRNAs: new direction in molecular epidemiology of solid cancer. *J Cell Mol Med*. 2012;16(1):8-21.
142. Iniesta R, Guinó E, Moreno V. [Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies]. *Gac Sanit*. 2005;19(4):333-41.
143. Rice TK, Schork NJ, Rao DC. *Genetic Dissection of Complex Traits*. 2 ed: Academic Press; 2008.
144. Sambrook J RD. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3 ed. USA: CSHL Press; 2001. 4–12 p.
145. Clague J, Lippman SM, Yang H, Hildebrandt MA, Ye Y, Lee JJ, et al. Genetic variation in MicroRNA genes and risk of oral premalignant lesions. *Mol Carcinog*. 2010;49(2):183-9.
146. Lee HC, Kim JG, Chae YS, Sohn SK, Kang BW, Moon JH, et al. Prognostic impact of microRNA-related gene polymorphisms on survival of patients with colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136(7):1073-8.

147. Wilker EH, Baccarelli A, Suh H, Vokonas P, Wright RO, Schwartz J. Black carbon exposures, blood pressure, and interactions with single nucleotide polymorphisms in MicroRNA processing genes. *Environ Health Perspect.* 2010;118(7):943-8.
148. Ye Y, Wang KK, Gu J, Yang H, Lin J, Ajani JA, et al. Genetic variations in microRNA-related genes are novel susceptibility loci for esophageal cancer risk. *Cancer Prev Res (Phila).* 2008;1(6):460-9.
149. Tian Z, Guo B, Yu M, Wang C, Zhang H, Liang Q, et al. Upregulation of micro-ribonucleic acid-128 cooperating with downregulation of PTEN confers metastatic potential and unfavorable prognosis in patients with primary osteosarcoma. *Onco Targets Ther.* 2014;7:1601-8.
150. Zhang X, Yang H, Lee JJ, Kim E, Lippman SM, Khuri FR, et al. MicroRNA-related genetic variations as predictors for risk of second primary tumor and/or recurrence in patients with early-stage head and neck cancer. *Carcinogenesis.* 2010;31(12):2118-23.
151. Wang L, Liu Z, Jing P, Shao L, Chen L, He X, et al. Effects of murine double minute 2 polymorphisms on the risk and survival of osteosarcoma: a systemic review and meta-analysis. *Tumour Biol.* 2013.
152. Bohlman S, Manfredi JJ. p53-independent effects of Mdm2. *Subcell Biochem.* 2014;85:235-46.
153. Ramírez-Bello J, Vargas-Alarcón G, Tovilla-Zárate C, Fragoso JM. [Single nucleotide polymorphisms (SNPs): functional implications of regulatory-SNP (rSNP) and structural RNA (srSNPs) in complex diseases]. *Gac Med Mex.* 2013;149(2):220-8.
154. Vucic D, Dixit VM, Wertz IE. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(7):439-52.
155. Liu G, Xu W, Hao Y, Xu Z. Letter regarding Wang et al. entitled "Effects of murine double minute 2 polymorphisms on the risk and survival of osteosarcoma: a systemic review and meta-analysis". *Tumour Biol.* 2014;35(4):3943-4.
156. Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:65-97.
157. Wang L, Jing F, Su D, Zhang T, Yang B, Jiao S, et al. Association between CTLA-4 rs231775 polymorphism and risk of colorectal cancer: a meta analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(1):650-7.
158. Antczak A, Pastuszek-Lewandoska D, Górski P, Domańska D, Migdalska-Sęk M, Czarnecka K, et al. Ctl-4 expression and polymorphisms in lung tissue of patients with diagnosed non-small-cell lung cancer. *Biomed Res Int.* 2013;2013:576486.
159. Gokhale P, Kerkar S, Tongaonkar H, Salvi V, Mania-Pramanik J. CTLA-4 gene polymorphism at position +49 A>G in exon 1: a risk factor for cervical cancer in Indian women. *Cancer Genet.* 2013;206(5):154-61.
160. Yan Q, Chen P, Lu A, Zhao P, Gu A. Association between CTLA-4 60G/A and -1661A/G polymorphisms and the risk of cancers: a meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(12):e83710.
161. Contardi E, Palmisano GL, Tazzari PL, Martelli AM, Falà F, Fabbi M, et al. CTLA-4 is constitutively expressed on tumor cells and can trigger apoptosis upon ligand interaction. *Int J Cancer.* 2005;117(4):538-50.
162. Liu J, Wang J, Jiang W, Tang Y. Effect of cytotoxic T-lymphocyte antigen-4, TNF-alpha polymorphisms on osteosarcoma: evidences from a meta-analysis. *Chin J Cancer Res.* 2013;25(6):671-8.
163. Chang Z, Song R, Xu S, Xu M, Yu X. CD 152 gene polymorphisms and risk of osteosarcoma in Chinese population. *Tumour Biol.* 2014;35(7):6809-14.
164. Feng D, Yang X, Li S, Liu T, Wu Z, Song Y, et al. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genetic variants and risk of Ewing's sarcoma. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2013;17(6):458-63.
165. Yang S, Wang C, Zhou Y, Sun G, Zhu D, Gao S. Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 polymorphisms and susceptibility to Ewing's sarcoma. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012;16(10):1236-40.

166. Hu L, Liu J, Chen X, Zhang Y, Liu L, Zhu J, et al. CTLA-4 gene polymorphism +49 A/G contributes to genetic susceptibility to two infection-related cancers-hepatocellular carcinoma and cervical cancer. *Hum Immunol.* 2010;71(9):888-91.
167. Bouqbis L, Izaabel H, Akhayat O, Pérez-Lezaun A, Calafell F, Bertranpetit J, et al. Association of the CTLA4 promoter region (-1661G allele) with type 1 diabetes in the South Moroccan population. *Genes Immun.* 2003;4(2):132-7.
168. Petit AP, Wohlbold L, Bawankar P, Huntzinger E, Schmidt S, Izaurralde E, et al. The structural basis for the interaction between the CAF1 nuclease and the NOT1 scaffold of the human CCR4-NOT deadenylase complex. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(21):11058-72.
169. Lau NC, Kolkman A, van Schaik FM, Mulder KW, Pijnappel WW, Heck AJ, et al. Human Ccr4-Not complexes contain variable deadenylase subunits. *Biochem J.* 2009;422(3):443-53.
170. Lee PH, Shatkay H. F-SNP: computationally predicted functional SNPs for disease association studies. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Database issue):D820-4.
171. Edwards NC, Hing ZA, Perry A, Blaisdell A, Kopelman DB, Fathke R, et al. Characterization of coding synonymous and non-synonymous variants in ADAMTS13 using ex vivo and in silico approaches. *PLoS One.* 2012;7(6):e38864.
172. Yang TP, Beazley C, Montgomery SB, Dimas AS, Gutierrez-Arcelus M, Stranger BE, et al. Genevar: a database and Java application for the analysis and visualization of SNP-gene associations in eQTL studies. *Bioinformatics.* 2010;26(19):2474-6.
173. Piao X, Zhang X, Wu L, Belasco JG. CCR4-NOT deadenylates mRNA associated with RNA-induced silencing complexes in human cells. *Mol Cell Biol.* 2010;30(6):1486-94.
174. Caudy AA, Ketting RF, Hammond SM, Denli AM, Bathoorn AM, Tops BB, et al. A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature.* 2003;425(6956):411-4.
175. Li S, Lian SL, Moser JJ, Fritzler ML, Fritzler MJ, Satoh M, et al. Identification of GW182 and its novel isoform TNGW1 as translational repressors in Ago2-mediated silencing. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 24):4134-44.
176. Yoo BK, Santhekadur PK, Gredler R, Chen D, Emdad L, Bhutia S, et al. Increased RNA-induced silencing complex (RISC) activity contributes to hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2011;53(5):1538-48.
177. Sand M, Skrygan M, Georgas D, Sand D, Gambichler T, Altmeyer P, et al. The miRNA machinery in primary cutaneous malignant melanoma, cutaneous malignant melanoma metastases and benign melanocytic nevi. *Cell Tissue Res.* 2012;350(1):119-26.
178. Heinrich EM, Wagner J, Krüger M, John D, Uchida S, Weigand JE, et al. Regulation of miR-17-92a cluster processing by the microRNA binding protein SND1. *FEBS Lett.* 2013;587(15):2405-11.
179. Li X, Yang H, Tian Q, Liu Y, Weng Y. Upregulation of microRNA-17-92 cluster associates with tumor progression and prognosis in osteosarcoma. *Neoplasma.* 2014;61(4):453-60.
180. Wilczynska A, Bushell M. The complexity of miRNA-mediated repression. *Cell Death Differ.* 2015;22(1):22-33.
181. Eulalio A, Helms S, Fritzschn C, Fauser M, Izaurralde E. A C-terminal silencing domain in GW182 is essential for miRNA function. *RNA.* 2009;15(6):1067-77.
182. Zhou Y, Chen L, Barlogie B, Stephens O, Wu X, Williams DR, et al. High-risk myeloma is associated with global elevation of miRNAs and overexpression of EIF2C2/AGO2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(17):7904-9.
183. Weng Y, Chen Y, Chen J, Liu Y, Bao T. Common genetic variants in microRNA processing machinery genes are associated with risk and survival in patients with osteosarcoma. *Mol Genet Genomics.* 2015.
184. Thayanithy V, Sarver AL, Kartha RV, Li L, Angstadt AY, Breen M, et al. Perturbation of 14q32 miRNAs-cMYC gene network in osteosarcoma. *Bone.* 2012;50(1):171-81.
185. Shimizu T, Ishikawa T, Sugihara E, Kuninaka S, Miyamoto T, Mabuchi Y, et al. c-MYC overexpression with loss of Ink4a/Arf transforms bone marrow stromal cells into osteosarcoma accompanied by loss of adipogenesis. *Oncogene.* 2010;29(42):5687-99.

186. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform.* 2011;44(5):839-47.
187. Kerns SL, Ostrer H, Stock R, Li W, Moore J, Pearlman A, et al. Genome-wide association study to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with the development of erectile dysfunction in African-American men after radiotherapy for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;78(5):1292-300.
188. Shi Y, Zhao H, Cao Y, Yang D, Li Z, Zhang B, et al. Genome-wide association study identifies eight new risk loci for polycystic ovary syndrome. *Nat Genet.* 2012;44(9):1020-5.
189. Won KY, Kim YW, Kim HS, Lee SK, Jung WW, Park YK. MicroRNA-199b-5p is involved in the Notch signaling pathway in osteosarcoma. *Hum Pathol.* 2013;44(8):1648-55.
190. Sarver AL, Phalak R, Thayanithy V, Subramanian S. S-MED: sarcoma microRNA expression database. *Lab Invest.* 2010;90(5):753-61.
191. Leaner VD, Chick JF, Donninger H, Linniola I, Mendoza A, Khanna C, et al. Inhibition of AP-1 transcriptional activity blocks the migration, invasion, and experimental metastasis of murine osteosarcoma. *Am J Pathol.* 2009;174(1):265-75.
192. Jiang J, Zhang Y, Yu C, Li Z, Pan Y, Sun C. MicroRNA-492 expression promotes the progression of hepatic cancer by targeting PTEN. *Cancer Cell Int.* 2014;14(1):95.
193. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:127-50.
194. Shen L, Chen XD, Zhang YH. MicroRNA-128 promotes proliferation in osteosarcoma cells by downregulating PTEN. *Tumour Biol.* 2014;35(3):2069-74.
195. Gao Y, Luo LH, Li S, Yang C. miR-17 inhibitor suppressed osteosarcoma tumor growth and metastasis via increasing PTEN expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;444(2):230-4.
196. Hu Y, Xu S, Jin W, Yi Q, Wei W. Effect of the PTEN gene on adhesion, invasion and metastasis of osteosarcoma cells. *Oncol Rep.* 2014;32(4):1741-7.
197. Beuten J, Gelfond JA, Martinez-Fierro ML, Weldon KS, Crandall AC, Rojas-Martinez A, et al. Association of chromosome 8q variants with prostate cancer risk in Caucasian and Hispanic men. *Carcinogenesis.* 2009;30(8):1372-9.
198. Shou J, Gu S, Gu W. Identification of dysregulated miRNAs and their regulatory signature in glioma patients using the partial least squares method. *Exp Ther Med.* 2015;9(1):167-71.
199. Fairman-Williams ME, Guenther UP, Jankowsky E. SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr Opin Struct Biol.* 2010;20(3):313-24.
200. Tedder TF, Tuscano J, Sato S, Kehrl JH. CD22, a B lymphocyte-specific adhesion molecule that regulates antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:481-504.
201. Markiewicz K, Zeman K, Kozar A, Gołębiewska-Wawrzyniak M, Woźniak W. [Evaluation of selected parameters of cellular immunity in children with osteosarcoma at diagnosis]. *Med Wieku Rozwoj.* 2012;16(3):212-21.
202. Zhao H, Li M, Li L, Yang X, Lan G, Zhang Y. MiR-133b is down-regulated in human osteosarcoma and inhibits osteosarcoma cells proliferation, migration and invasion, and promotes apoptosis. *PLoS One.* 2013;8(12):e83571.
203. Novello C, Pazzaglia L, Cingolani C, Conti A, Quattrini I, Manara MC, et al. miRNA expression profile in human osteosarcoma: role of miR-1 and miR-133b in proliferation and cell cycle control. *Int J Oncol.* 2013;42(2):667-75.
204. Fountzilias E, Kelly AD, Perez-Atayde AR, Goldsmith J, Konstantinopoulos PA, Francoeur N, et al. A microRNA activity map of human mesenchymal tumors: connections to oncogenic pathways; an integrative transcriptomic study. *BMC Genomics.* 2012;13:332.
205. You L, Gu W, Chen L, Pan L, Chen J, Peng Y. MiR-378 overexpression attenuates high glucose-suppressed osteogenic differentiation through targeting CASP3 and activating PI3K/Akt signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(10):7249-61.

206. Hupkes M, Sotoca AM, Hendriks JM, van Zoelen EJ, Dechering KJ. MicroRNA miR-378 promotes BMP2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *BMC Mol Biol.* 2014;15:1.
207. Kahai S, Lee SC, Lee DY, Yang J, Li M, Wang CH, et al. MicroRNA miR-378 regulates nephronectin expression modulating osteoblast differentiation by targeting GalNT-7. *PLoS One.* 2009;4(10):e7535.
208. Rogers MB, Shah TA, Shaikh NN. Turning Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP2) On and Off in Mesenchymal Cells. *J Cell Biochem.* 2015.
209. Takahashi H, Nishimura J, Kagawa Y, Kano Y, Takahashi Y, Wu X, et al. Significance of polypyrimidine tract binding protein 1 expression in colorectal cancer. *Mol Cancer Ther.* 2015.
210. Ferrarese R, Harsh GR, Yadav AK, Bug E, Maticzka D, Reichardt W, et al. Lineage-specific splicing of a brain-enriched alternative exon promotes glioblastoma progression. *J Clin Invest.* 2014;124(7):2861-76.
211. Cheung HC, Hai T, Zhu W, Baggerly KA, Tsavachidis S, Krahe R, et al. Splicing factors PTBP1 and PTBP2 promote proliferation and migration of glioma cell lines. *Brain.* 2009;132(Pt 8):2277-88.
212. David CJ, Chen M, Assanah M, Canoll P, Manley JL. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature.* 2010;463(7279):364-8.
213. Yang X, Feng M, Jiang X, Wu Z, Li Z, Aau M, et al. miR-449a and miR-449b are direct transcriptional targets of E2F1 and negatively regulate pRb-E2F1 activity through a feedback loop by targeting CDK6 and CDC25A. *Genes Dev.* 2009;23(20):2388-93.
214. .
215. Kondo Y, Hanai A, Nakai W, Katoh Y, Nakayama K, Shin HW. ARF1 and ARF3 are required for the integrity of recycling endosomes and the recycling pathway. *Cell Struct Funct.* 2012;37(2):141-54.
216. Boulay PL, Schlienger S, Lewis-Saravalli S, Vitale N, Ferbeyre G, Claing A. ARF1 controls proliferation of breast cancer cells by regulating the retinoblastoma protein. *Oncogene.* 2011;30(36):3846-61.
217. Uehara R, Nozawa RS, Tomioka A, Petry S, Vale RD, Obuse C, et al. The augmin complex plays a critical role in spindle microtubule generation for mitotic progression and cytokinesis in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(17):6998-7003.
218. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvald JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-9.
219. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820(7):940-8.
220. Diao CY, Guo HB, Ouyang YR, Zhang HC, Liu LH, Bu J, et al. Screening for metastatic osteosarcoma biomarkers with a DNA microarray. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(4):1817-22.
221. Kim WH, Min KT, Jeon YJ, Kwon CI, Ko KH, Park PW, et al. Association study of microRNA polymorphisms with hepatocellular carcinoma in Korean population. *Gene.* 2012;504(1):92-7.
222. Ahn DH, Rah H, Choi YK, Jeon YJ, Min KT, Kwack K, et al. Association of the miR-146aC>G, miR-149T>C, miR-196a2T>C, and miR-499A>G polymorphisms with gastric cancer risk and survival in the Korean population. *Mol Carcinog.* 2013;52 Suppl 1:E39-51.
223. Vinci S, Gelmini S, Mancini I, Malentacchi F, Pazzagli M, Beltrami C, et al. Genetic and epigenetic factors in regulation of microRNA in colorectal cancers. *Methods.* 2013;59(1):138-46.
224. Xiang Y, Fan S, Cao J, Huang S, Zhang LP. Association of the microRNA-499 variants with susceptibility to hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Mol Biol Rep.* 2012;39(6):7019-23.

225. Alshatwi AA, Shafi G, Hasan TN, Syed NA, Al-Hazzani AA, Alsaif MA, et al. Differential expression profile and genetic variants of microRNAs sequences in breast cancer patients. *PLoS One*. 2012;7(2):e30049.
226. Qiu MT, Hu JW, Ding XX, Yang X, Zhang Z, Yin R, et al. Hsa-miR-499 rs3746444 polymorphism contributes to cancer risk: a meta-analysis of 12 studies. *PLoS One*. 2012;7(12):e50887.
227. Fan C, Chen C, Wu D. The association between common genetic variant of microRNA-499 and cancer susceptibility: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2013;40(4):3389-94.
228. Peng Q, Li S, Lao X, Chen Z, Li R, Deng Y, et al. The association of common functional polymorphisms in mir-146a and mir-196a2 and hepatocellular carcinoma risk: evidence from a meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2014;93(29):e252.
229. Fu B, Song P, Lu M, Wang B, Zhao Q. The association between miR-146a gene rs2910164 polymorphism and gastric cancer risk: a meta-analysis. *Biomed Pharmacother*. 2014;68(8):923-8.
230. Xu Z, Zhang L, Cao H, Bai B. MiR-146a rs2910164 G/C polymorphism and gastric cancer susceptibility: a meta-analysis. *BMC Med Genet*. 2014;15(1):117.
231. Jazdzewski K, Liyanarachchi S, Swierniak M, Pachucki J, Ringel MD, Jarzab B, et al. Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(5):1502-5.
232. Meng Q, Zheng M, Liu H, Song C, Zhang W, Yan J, et al. TRAF6 regulates proliferation, apoptosis, and invasion of osteosarcoma cell. *Mol Cell Biochem*. 2012;371(1-2):177-86.
233. López-Álvarez MR, Jones DC, Jiang W, Traherne JA, Trowsdale J. Copy number and nucleotide variation of the LILR family of myelomonocytic cell activating and inhibitory receptors. *Immunogenetics*. 2014;66(2):73-83.
234. Atiye J, Wolf M, Kaur S, Monni O, Böhling T, Kivioja A, et al. Gene amplifications in osteosarcoma-CGH microarray analysis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;42(2):158-63.
235. Bridge JA, Nelson M, McComb E, McGuire MH, Rosenthal H, Vergara G, et al. Cytogenetic findings in 73 osteosarcoma specimens and a review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997;95(1):74-87.
236. Hoogerwerf WA, Hawkins AL, Perlman EJ, Griffin CA. Chromosome analysis of nine osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994;9(2):88-92.
237. Sanz G, Leray I, Dewaele A, Sobilo J, Lerondel S, Bouet S, et al. Promotion of cancer cell invasiveness and metastasis emergence caused by olfactory receptor stimulation. *PLoS One*. 2014;9(1):e85110.
238. Evers BM, Ishizuka J, Townsend CM, Thompson JC. The human carcinoid cell line, BON. A model system for the study of carcinoid tumors. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;733:393-406.
239. Weng J, Wang J, Cai Y, Stafford LJ, Mitchell D, Ittmann M, et al. Increased expression of prostate-specific G-protein-coupled receptor in human prostate intraepithelial neoplasia and prostate cancers. *Int J Cancer*. 2005;113(5):811-8.
240. Cui T, Tsolakis AV, Li SC, Cunningham JL, Lind T, Öberg K, et al. Olfactory receptor 51E1 protein as a potential novel tissue biomarker for small intestine neuroendocrine carcinomas. *Eur J Endocrinol*. 2013;168(2):253-61.

