



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS



TÍTULO DEL TRABAJO

“Evaluación de los microRNAs miR-1290 y miR-26b como posibles reguladores de NAT1 en plasma de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

PRESENTA

Q.F.B. Dinora Margarita Alvarado Zamarripa

DIRECTOR

Dr. Juan Manuel Vargas Morales

Co-DIRECTORA

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

ASESOR

Dra. Edith Elena Uresti Rivera

San Luis Potosí, S.L.P. 20 de septiembre del 2021



El programa de Maestría en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 003383, en el Nivel EN DESARROLLO.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT:745696
CVU 1007624

El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Medicina Molecular y Traslacional del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomédicina CICSaB de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí

Registro: 25-17



Evaluación de los microRNAs miR-1290 y miR-26b como posibles reguladores de NAT1 en plasma de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda by Dinora Margarita Alvarado Zamarripa is licensed under a [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
POSGRADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS



TÍTULO DEL TRABAJO

“Evaluación de los microRNAs miR-1290 y miR-26b como posibles reguladores de NAT1 en plasma de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

PRESENTA

Q.F.B. Dinora Margarita Alvarado Zamarripa

SINODALES

PRESIDENTE

Dr. Juan Manuel Vargas Morales -----

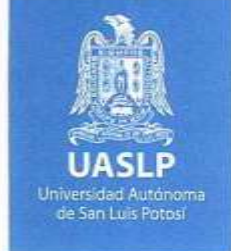
SECRETARIO

Dra. Diana Patricia Portales Pérez -----

PRIMER VOCAL

Dra. Edith Elena Uresti Rivera -----

San Luis Potosí, S.L.P. 20 de septiembre 2021



San Luis Potosí, S.L.P.

Agosto 15, 2021

Comité Académico del Posgrado

En Ciencias Farmacobiológicas

Facultad de Ciencias Químicas/UASLP

Por este medio nos permitimos comunicarles que la tesis llevada a cabo por la alumna de Maestría Q.F.B. Dinora Margarita Alvarado Zamarripa, titulada "Evaluación de los microRNAs miR-1290 y miR-26b como posibles reguladores de NAT1 en plasma de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda" ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación la cual tendrá lugar el próximo lunes 20 de septiembre del año en curso en el auditorio G-203 de la Facultad.

ANTENTAMENTE

Dr. Juan Manuel Vargas Morales
Director de Tesis

Dra. Diana Patricia Portales Pérez
Co-Directora

Dra. Edith Uresti Rivera
Asesor

www.uaslp.mx

Av. Dr. Manuel Nava Núm. 6
Zona Universitaria • CP 78210
San Luis Potosí, S.L.P.
tel. (444) 826 24-40 al 46
fax (444) 826 2372

DEDICATORIAS

A Dios, por prestarme la vida y darme fuerzas para continuar en este camino de constantes cambios.

A mis padres, por la educación que me han dado, por ayudarme a convertirme en una persona de bien e impulsarme a ser mejor cada día, por las palabras de aliento en momentos difíciles en los que no se veía la salida, por creer en mí y por su apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida.

A mi hermano, por ser ejemplo a seguir.

A mi familia, por su apoyo incondicional en todo momento.

A mi directores y asesores por ser inspiración de superación y perseverancia en el campo de la ciencia básica.

A mis roomies Frida y Ceci, por aligerarme los días con las risas y buenos momentos compartidos, por las tardes de café y las noches de estudio.

A mis compañeros del LMMT por los momentos compartidos, así como los conocimientos aportados para llevar a cabo este proyecto.

*“La vida no es fácil para nadie. ¿Y qué importa?
Debemos tener perseverancia y confianza
en nosotros mismos, creer que tenemos un don
para algo y que ese algo debe ser realizado”*

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Manuel por brindarme confianza y apoyo para integrarme a este proyecto, por su asesoría y conocimiento compartido.

A la Dra. Diana, por la confianza depositada en mí, por el conocimiento transmitido y por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo.

A la Dra, Edith, por su disposición, por transmitirme sus conocimientos y asesorarme en el campo de la biología molecular.

A Ernesto, por su paciencia, disposición y apoyo en todo momento.

Al equipo de estudiantes del CICSaB, por compartir sus conocimientos y por el apoyo en la parte experimental.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca y el financiamiento otorgado.

RESUMEN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer pediátrico más común entre los 5 y 14 años de edad. Alteraciones en la expresión de enzimas metabolizadoras de medicamentos y xenobióticos, como NAT1 modifican la susceptibilidad o riesgo a cáncer, incluido la LLA. Los mecanismos de regulación epigenética, como los miRNAs desempeñan un rol importante en el desarrollo y progresión de la LLA. La alteración en la expresión de los miRNAs altera a su vez la expresión de distintos genes, incluido NAT1. El objetivo de este estudio fue evaluar los niveles de los miRNAs miR-1290 y miR-26b en plasma de pacientes pediátricos con LLA-B y determinar si existe diferencia en su expresión comparados con sujetos control. La expresión relativa de miR-1290 y miR-26b circulantes fue detectada por medio de RT-qPCR y determinada con el método $2^{-\Delta CT}$ en plasma de pacientes con LLA-B (n=17) y un grupo control (n=17), usando miR-16-5p como control endógeno. Las variables antropométricas y demográficas fueron similares en ambos grupos de estudio. Los niveles de glóbulos blancos, linfocitos, eritrocitos y hemoglobina están disminuidos en pacientes con LLA en comparación al grupo control. Los niveles circulantes en plasma de miR-1290 muestran una diferencia marginalmente significativa en su expresión en pacientes con LLA comparado con el grupo control ($p=0.06$), mostrando una tendencia al incremento en el grupo de pacientes con LLA con una razón de cambio de 3.5 veces, además, las mujeres con LLA muestran una mayor expresión de miR-1290 comparado con el grupo control, y a su vez, los pacientes que muestran mayor expresión de dicho miRNA, mostraron recaída, sin embargo no hay una asociación significativa entre dichas variables. En contraste, miR-26b no muestra diferencia entre los grupos de estudio. Se analizó la correlación lineal entre los niveles de expresión de miR-1290 y el valor absoluto de NAT1 ($r=-0.13$ $p=0.65$) así como entre la expresión relativa de NAT1 y linfocitos en el grupo control. ($r=-0.59$, $p=0.02$). miR-1290 circulante es un potencial mecanismo de regulación epigenética de la expresión de NAT1 en LLA. Estudios adicionales permitirán proponer un rol para miR-1290 como biomarcador pronóstico o posible blanco terapéutico en LLA.

Palabras clave: Leucemia linfoblástica aguda, NATs, miRNAs

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is one of the most common malignancies in children between ages 5 and 14 years. Modifications on the expression or activity of drug and xenobiotic metabolizing enzymes like NAT1, could be associated with the risk of cancer. Epigenetic regulation plays an important role on the development and progression of this disease; one important epigenetic mechanism are miRNAs, that serve as important regulators of gene expression. Aberrant expression of miRNAs could affect the expression of their target genes, like NAT1, contributing to ALL. We aim to evaluate the levels of circulating microRNAs miR-1290 and miR-26b in plasma of pediatric patients with B-ALL and determine if there is a difference in their expression compared to control subjects. The expression levels of miR-1290 and miR-26b in plasma were detected by RT-qPCR. In plasma of patients with B-ALL (n=17) and control subjects (n=17), miR 16-5p was used as endogenous control. Relative expression was determined with the $2^{-\Delta Ct}$ method. Hematologic parameters were evaluated and associated with the absolute value of NAT1 by Spearman correlation. Last, expression levels of miR-1290 were associated with the absolute value and activity of NAT1. There was no difference in demographic and anthropometric measures between study groups ($p>0.05$). Hematologic measures that showed decrease in ALL patients were white blood cells, lymphocytes, erythrocytes and hemoglobin concentration. Only miR-1290 was found to show a trend to be overexpressed in ALL patients compared to control subjects ($p=0.06$) with a fold-change of 3.5, meanwhile miR-26b showed no difference in its expression between both groups of study ($p=0.43$). Association between expression of miR-1290 and activity and absolute value of NAT1 ($r=-0.13$ $p=0.65$) Negative association was found between relative expression of miR-1290 and lymphocytes in control group ($r=-0.59$, $p=0.02$). Our study showed that circulating miR-1290 in plasma as a possible epigenetic mechanism of NAT1 regulation, differed in its expression in ALL patients. However, more studies are required to propose a role of miR-1290 as a biomarker of prognosis and therapy in ALL.

Key words: Acute lymphoblastic leukemia, NATs, miRNAs

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Leucemia linfoblástica aguda (LLA)	1
1.2 NAT1.....	2
1.3 Alteraciones genéticas en LLA.....	3
1.4 Alteraciones epigenéticas en LLA.....	3
1.5 microRNAs.....	5
1.6 microRNAs en LLA.....	5
2. ANTECEDENTES.....	7
3. JUSTIFICACIÓN.....	10
4. HIPÓTESIS.....	11
5. OBJETIVOS.....	11
5.1 Objetivo general	11
5.2 Objetivos específicos	11
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
6.1 Diseño metodológico.....	12
6.2 Definición de la población	12
6.2.1 Tipo de muestreo	12
6.2.2 Tamaño de la muestra	13
6.2.3 Lugar de realización.....	13
6.3 Variables de estudio:.....	13
6.4 Criterios de selección.....	13
6.4.1 Criterios de inclusión grupo control.....	13
6.4.2 Criterios de no inclusión grupo control.....	14
6.4.3 Criterios de inclusión grupo de pacientes con LLA	14
6.4.4 Criterios de no inclusión grupo de pacientes con LLA	14
6.4.5 Criterios de eliminación grupo control y grupo de pacientes con LLA.....	14
6.5 Selección de miRNAs en estudio	14
6.6 Análisis descriptivo de los grupos de estudio.....	15
6.7 Obtención de muestras sanguíneas.....	15

6.8 Extracción de ARN.....	16
6.9 Optimización de RT-qPCR.....	16
6.10 Síntesis del DNA complementario (DNAC).....	18
6.11 PCR tiempo real (qPCR).....	19
6.12 Análisis estadístico.....	20
6.13 Consideraciones éticas	20
7. RESULTADOS	21
7.1 Características de los grupos de estudio	21
7.2 Evaluación de miR-16-5p como control endógeno.....	25
7.3 Expresión relativa de miR-1290 y miR-26b circulantes.....	26
7.4. Estratificación de pacientes y controles y la expresión relativa de miR-1290 y miR-26b circulantes	28
7.5 Expresión relativa de miR-1290 y miR-26b en pacientes con recaída	31
7.6 Asociación de miR-1290 con NAT1 y variables hematológicas	32
8. DISCUSIÓN	34
9. CONSLUSIONES.....	43
10. PERSPECTIVAS.....	44
11. BIBLIOGRAFÍA	45
12. ANEXOS	51
Anexo 1.- Categorización de variables.....	51
13. GLOSARIO.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- miRNAs alterados en LLA	7
Tabla 2.- Primers de los miRNAs evaluados con su tipo, secuencia y número de acceso	16
Tabla 3.- Reactivos de RT para la obtención de DNAc.	17
Tabla 4.- Programa de RT para la obtención de DNAc	17
Tabla 5.- Concentraciones utilizadas de primers y sonda de miR-16-5p, miR-1290 y miR-26b para optimización de RT-qPCR	18
Tabla 6.- Condiciones de amplificación de la qPCR.....	18
Tabla 7.- Concentraciones óptimas de reactivos para la evaluación de miRNAs por medio de qPCR individual y dúplex.....	19
Tabla 8.- Características demográficas y antropométricas de los grupos de estudio	21
Tabla 9.- Análisis descriptivo de pacientes pediátricos con LLA	22
Tabla 10.- Características clínicas de los grupos de estudio	24
Tabla 11.- Expresión relativa de miR-1290 y miR-26b	26
Tabla 12.- Expresión relativa de miR-1290 y miR-26b en subgrupos	29
Tabla 13.- Prueba exacta de Fisher y análisis de la sobreexpresión de miR-1290 y sexo en pacientes con LLA	30
Tabla 14.- Prueba exacta de Fisher y análisis de la sobreexpresión de miR-1290 y recaída en LLA	32
Tabla 15.- Correlaciones de Spearman entre la expresión relativa de miR-1290 y las variables hematológicas	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.- Parámetros hematológicos que muestran una disminución significativa en sus valores en pacientes con LLA	23
Fig. 2.- Evaluación de miR-16-5p como control endógeno.....	25
Fig. 3.- Expresión relativa de miR-1290 en grupo control y pacientes con LLA	27
Fig. 4.- Expresión relativa de miR-26b en grupo control y pacientes con LLA.	28
Fig. 5.- Expresión relativa de miR-1290 en mujeres con LLA.....	30
Fig. 6 Expresión relativa de miR-1290 en pacientes con recaída.....	31
Fig. 7.- Asociación entre la expresión relativa de miR-1290 y el valor absoluto de NAT1	33
Fig. 8.- Correlación de Spearman entre la expresión relativa de miR-1290 y los valores de linfocitos en el grupo control.	34

ABREVIACIONES

%	Por ciento
°C	Grados Celsius
µg	microgramos
µL	Microlitro
A	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	DNA complementario
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
CMN	Células mononucleares
Ct	Ciclo umbral de la PCR cuantitativa
dL	Decilitro
dNTP	Deoxinucleósido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Fig.	Figura
fL	Femtolitro
g	Gramos
h	Hora
K	Mil
IMC	Índice de masa corporal
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLA-B	Leucemia linfoblástica aguda subtipo B
LLA-T	Leucemia linfoblástica aguda subtipo T
M	Millón
MCV	Volumen corpuscular medio
MCH	Hemoglobina corpuscular media
MCHC	Concentración de hemoglobina corpuscular media
min	Minutos

miRNA	micro-RNA
nm	nanómetros
NAT	N-acetiltransferasa
NAT1	N-acetiltransferasa 1
NAT2	N-acetiltransferasa 2
nm	Nanómetro
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
qPCR	PCR cuantitativa, PCR tiempo real
RDW	Amplitud de distribución eritrocitaria
RT-qPCR	PCR con retrotranscripción
RT	Retrotranscripción
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
SNP	Polimorfismo genético de un solo nucleótido
U	Unidades Internacionales
UTR	Región no traducible

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Leucemia linfoblástica aguda (LLA)

El cáncer es un problema prioritario de salud pública, por su alta incidencia y tasa de mortalidad. La Leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia más común diagnosticada en pacientes menores de 15 años, lo que representa aproximadamente el 25% de las neoplasias en este grupo de edad y un 76% de todas las leucemias (Rivera-Luna et al., 2013) (Pérez-Saldivar et al., 2011)

La LLA surge como consecuencia de la proliferación neoplásica de la célula progenitora linfóide de células B (80-85%) o células T (20-25%). Clasificada en el CIE-10 como C91.0. Alteraciones genéticas y epigenéticas, influyen en la diferenciación y maduración de las células madre hematopoyéticas, con detención o alteración en el proceso de diferenciación, así como una proliferación anormal de los linfoblastos -células de gran tamaño con escaso citoplasma- en la médula ósea (Instituto Nacional de Cáncer) (Chow et al., 2017)

Dentro de los factores de riesgo de LLA se encuentra el síndrome de Down, el síndrome de Bloom y la anemia de Fanconi, sin embargo, esta predisposición genética representa solo aproximadamente el 10% de los casos. (J. Zhang et al., 2015) (Chessells et al., 2001). Otros factores de riesgo son la exposición a radiaciones ionizantes, medicamentos quimioterapéuticos específicos, pesticidas, así como translocaciones cromosómicas. Cambios en los mecanismos de regulación epigenética, juegan un papel importante en el proceso de generación de LLA (San Jose-Eneriz et al., 2013). Es fundamental el estudio de las modificaciones genéticas y epigenéticas de la LLA a fin de incrementar el conocimiento sobre la etiología de la enfermedad, así como para la búsqueda de nuevos marcadores para el diagnóstico, pronóstico y blancos terapéuticos. (Burke et al., 2014)

1.2 NAT1

La acetilación es una reacción de fase II importante en el proceso de metabolismo de medicamentos y xenobioticos ambientales. Esta se lleva a cabo por las enzimas arilamina N-acetiltransferasas (NATs), una familia de enzimas altamente conservadas que están presentes en células procariotas y en eucariotas. (Butcher et al., 2005) En los humanos, hay dos genes que expresan diferentes isoenzimas: NAT1 y NAT2. (Hein et al., 1993)

La acetilación es la mejor ruta de biotransformación para muchos fármacos de arilaminas, aminas heterocíclicas y sustratos de hidracina, así como para un gran número de carcinógenos conocidos presentes en la dieta, el humo del cigarro y el ambiente. Estas enzimas pueden activar o inactivar las aminas carcinógenas aromáticas o heterocíclicas, dependiendo del tipo específico de acetilación presente. (Zenser et al., n.d.)(Kato, 1986)

NAT1 se encuentra ampliamente expresado en tejido embrionario y tejido adulto; su actividad o expresión modificada ha sido relacionada con el desarrollo de varios tipos de cáncer debido a su rol en la activación metabólica y detoxificación de carcinógenos. Algunos autores han sugerido que NAT1 puede actuar como regulador del crecimiento celular y supervivencia en cáncer, y ha sido mejor caracterizado en cáncer de mama y colon, sin embargo, los mecanismos moleculares que conducen a estos efectos aún no han sido bien entendidos. El crecimiento tumoral *in vivo* al bloquear la expresión de NAT1 de células HT-29, disminuyó significativamente su desarrollo en comparación con la línea celular parental (Tiang et al., 2011), mientras que la inhibición de NAT1 en células MDA-MB-231 disminuye el crecimiento *in vitro* e inhibe *in vivo* la metástasis a los pulmones. (Tiang et al., 2015) Sin embargo, su papel en el desarrollo o progresión de LLA no ha sido descrito.

1.3 Alteraciones genéticas en LLA

La LLA se clasifica en subgrupos de acuerdo con la presencia de alteraciones genéticas, las cuales tienen una fuerte influencia en el pronóstico de los pacientes. Aproximadamente el 75% de los casos de LLA pediátrica presentan alguna alteración cromosómica numérica o estructural, convirtiéndola en una entidad compleja y heterogénea. Las aneuploidías y las translocaciones cromosómicas son las alteraciones genéticas más comúnmente encontradas en este padecimiento. En leucemias pediátricas de linaje de células B, las translocaciones t (12;21) (*TEL-AML1/ETV6-RUNX1*), t (1;19) (*E2A-PBX1/TCF3-PBX1*) y t (9;22) (*BCR-ABL*) y las fusiones que involucran al gen *MLL* (principalmente *MLL-AF4*) son las anomalías genéticas mejor caracterizadas y de mayor frecuencia. (Mullighan, 2012)

Por otra parte, polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en las enzimas involucradas en el metabolismo de medicamentos y xenobioticos ambientales, tales como las arilamina N-acetiltransferasas 1 (NAT1) y 2 (NAT2). Los SNPs de dichas enzimas, llevan a la generación de acetiladores rápidos o lentos, a su vez puede conducir a una pérdida o modificación en la actividad de dichas enzimas, siendo posibles factores en el desarrollo de una variedad de tumores. Una mayor frecuencia del alelo NAT1*4 ha sido encontrada en pacientes con LLA (Krajinovic et al., 2000) Hernández-González en 2018, encontró una asociación significativa entre el desarrollo de LLA y la presencia de los haplotipos NAT1*3 y NAT1*4 así como el fenotipo de NAT1 rápido. La presencia de SNPs en NAT1, pueden modificar su actividad enzimática. Sin embargo, NAT1 también está regulada a nivel post-transcripcional y por factores ambientales.

1.4 Alteraciones epigenéticas en LLA

La epigenética estudia los cambios heredables que llevan a modificaciones en la expresión génica y que no implican alteraciones en la secuencia del DNA. Entre los mecanismos epigenéticos más estudiados se encuentran la metilación del DNA, la

modificación de histonas, la remodelación de nucleosomas y la regulación de RNAs no codificantes. Si estas modificaciones epigenéticas conducen a un silenciamiento de genes supresores tumorales, o bien, a la activación de oncogenes, resulta fácil conceptualizar como estas modificaciones epigenéticas son fundamentales en el desarrollo y progresión de la LLA. (Burke et al., 2014) (Dawson & Kouzarides, 2012) La alteración en dichos mecanismos epigenéticos, suelen conducir a la interrupción de procesos carcinogénicos importantes como apoptosis, reparación del ADN, puntos de control del ciclo celular y diferenciación celular, así como la activación de vías de metástasis/invasión, resistencia a fármacos y transducción de señales de proliferación. (Burke et al., 2014) Diversos estudios sobre la modificación epigenética han sido realizados en pacientes con LLA.

En un estudio de cohorte que incluía pacientes con LLA-B y LLA-T, Figueroa et al. En 2013, encontraron distintas marcas de metilación de ADN correlacionadas en forma significativa con la expresión génica característica de varios subtipos citogenéticos. Un conjunto de genes comúnmente desregulados epigenéticamente fue identificado, sugiriendo su rol central en la iniciación y progresión de LLA

Por otra parte, cambios en la acetilación de histonas puede contribuir a la carcinogénesis a través de la regulación transcripcional alterada de genes involucrados en diversos procesos celulares. El incremento en la expresión de desacetilasas de histonas, puede conducir a una disminución de la acetilación de histonas. Moreno et al. en 2010, identificaron una alta expresión de genes de desacetilasas de histonas (*HDAC2*, *HDAC3*, *HDAC8*, *HDAC6* y *HDAC7*) en pacientes con LLA. Además, *HDAC6* y *HDAC9* se encontraban sobreexpresadas en LLA-B, mientras que *HDAC1* and *HDAC4* mostraban sobreexpresión en LLA-T pudiendo conducir a un silenciamiento de genes.

1.5 microRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños fragmentos de RNA no codificante, altamente conservados de 18-25 nucleótidos de longitud que se encargan de regular la expresión de más del 60% de los genes humanos. Esta regulación la ejercen por medio de la unión perfecta o imperfecta a la región 3'UTR del RNAm blanco, resultando en la degradación o represión de la traducción ya sea por medio de la desadenilación o por la remoción del CAP del RNAm.(Bartel, 2009)

Los miRNAs tienen diferentes funciones regulatorias a nivel del desarrollo y proliferación celular, así como en diferentes procesos de desarrollo tumoral, participan en la regulación del ciclo celular, diferenciación, apoptosis e invasión (Gangaraju & Lin, 2009). La participación de diversos miRNAs en cáncer es como oncogenes o supresores tumorales. Dada la importancia de los miRNAs en los procesos de generación tumoral, su expresión en enfermedades y tejidos específicos, su estabilidad metabólica en tejidos y líquidos biológicos, incluyendo suero, plasma y orina, resultan tener un gran potencial como blancos terapéuticos, así como potenciales biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de cáncer, incluido LLA. (Shah et al., 2010) (C. Li et al., 2009) NAT1 es blanco de regulación de distintos miRNAs, por lo que, perfiles de expresión alterados pueden conducir a una modificación en su expresión.

1.6 microRNAs en LLA

La expresión aberrante de miRNAs es una característica común de malignidad tanto en tumores sólidos como en desórdenes hematológicos (Calin & Croce, 2006). Las células cancerosas de los pacientes tienen diferentes patrones de expresión de miRNAs en comparación con células hematopoyéticas normales de sujetos sanos. (Dixon-McIver et al., 2008) (Garzon et al., 2008)

Se ha propuesto que el perfil de expresión de miRNAs puede diferenciar los diferentes tipos de cáncer y estadio del tumor de una manera más exacta que el análisis tradicional de expresión de genes (Lu et al., 2005) En LLA-B y LLA-T de niños y adultos, se han identificado alteraciones en la expresión de distintos miRNAs implicados en diversas vías de regulación celular. (Chatterton et al., 2010)

Por otra parte, distintos perfiles de expresión de miRNAs han sido relacionados con resistencia a quimioterapia en pacientes con LLA y a una menor supervivencia libre de eventos. Schotte et. al., identificaron una menor expresión de miR-454 (razón de cambio de 1.9 veces) en blastos de pacientes con LLA mostrando resistencia a L-asparaginasa, mientras que los pacientes que mostraron resistencia a vincristina y daunorrubicina sobreexpresaban miR-99a, miR-100 y miR-125b (razón de cambio 14-25 veces) por lo que dichos miRNAs pueden ser biomarcadores de resistencia a medicamentos en LLA o posibles blancos terapéuticos con el fin de lograr una mejor respuesta al tratamiento y mayores tasas de remisión.

En la tabla 1 se incluyen algunos estudios que se han enfocado en el perfil de expresión de miRNAs en pacientes con LLA y la relación de estos con la patología. Los perfiles de expresión de miRNAs, en combinación con análisis citogenéticos y moleculares resultan de utilidad para clasificar a los pacientes en subgrupos y se puede definir resultados clínicos para dicha enfermedad. Conocer estos perfiles de expresión de miRNAs pueden ser de utilidad en el diagnóstico, clasificación y pronóstico de LLA. (Schotte et al., 2011)(Juliussen et al., 1990).

Tabla 1.- miRNAs alterados en LLA

Tipo de Leucemia	Observaciones	Referencia
LLA-B	↑miR-222, miR-339, miR-142-3p ↓miR-451, miR-373	(Ju X. et al. 2009)
LLA	↑miR-31a, miR-126, miR-18b, miR-363,miR-374a, miR-128a ↓miR-27a, miR-30b	(J. Zhang et al., 2015)
LLA	↑miR-128a, miR-708, miR-222, miR-125b	(Luan et al., 2015)
LLA-T	↑miR-25 proliferación, migración e invasión	(Xu et al. 2016)
LLA	↑miR-1290 ↓miR-151-5p, miR-451	(Avugad et al. 2016)
LLA-B y LLA-T	↑miR-125-1, miR-203 subtipos de LLA	(Swellam et al., 2018)
LLA	↓miR-326, miR-200c biomarcadores de quimiorresistencia	(Ghodousi & Rahgozar, 2018)

2. ANTECEDENTES

El proceso de generación de LLA involucra, además de alteraciones a nivel genético, un proceso de desregulación epigenética, que conduce al desarrollo de la enfermedad, siendo uno de ellos, la regulación en la expresión genética por miRNAs.

Uno de los principales antecedentes que conduce a la búsqueda de mecanismos que pudieran influir en el desarrollo de LLA, es el trabajo realizado por Hernández, O. *et al.* (2017), donde se evaluaron los SNPs de las enzimas arilaminas N-acetiltransferasas 1 y 2 (NAT1 y NAT2), encontrando una asociación significativa entre el desarrollo de LLA y la presencia de haplotipos NAT1*3, NAT1*4, NAT2*6B, NAT2*6J y los fenotipos de acetiladores NAT1 rápidos y NAT2 lentos. Los fenotipos de acetiladores NAT1 rápidos y NAT2 lentos pueden influir en el desarrollo de LLA. Aunque, la asociación entre algunos de los SNPs con la actividad y expresión de NAT1, no fue significativa,

sugiere, que existen otros mecanismos involucrados en la regulación de estos genes, uno de ellos, los miRNAs. (Hernández-González, O. datos en proceso de publicación)

Por otra parte, los miRNAs pueden estar involucrados en la linfopoyesis maligna, por lo que pueden ser biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y como potenciales blancos terapéuticos. Alrededor del 75% de los casos de LLA infantil contienen una o más anomalías cromosómicas y puede involucrar linajes B o T y conllevar a un paro de maduración linfóide en etapas distintas, dando lugar a inmunofenotipos con diferentes firmas de miRNA. Hernández, Y *et. al* (2016) evaluaron la expresión de miR-26b en pacientes con LLA, encontrando que la expresión de este miRNA tiende a disminuir en pacientes con LLA en comparación con el grupo sin LLA, el cual puede tener funciones supresoras de tumor al ser sobreexpresado. NAT1 es un posible blanco de regulación de miR-26b (Hernandez & Pantiga, 2016)

Resulta importante la búsqueda de posibles genes blanco regulados por miRNAs y que, a su vez, su expresión y actividad aberrante puedan estar involucrados en el proceso de cáncer. NAT1 y NAT2 al participar en la biotransformación de aminas aromáticas presentes en el humo del tabaco, el medio ambiente, y dieta resultan ser blancos de regulación epigenética en la generación de cáncer. Esto condujo a nuestro grupo de trabajo a la búsqueda y evaluación mediante herramientas bioinformáticas como miRanda, DIANA tools, miRTarBase y TargetScan de miRNAs como posibles reguladores de NAT1, como un mecanismo de regulación en su expresión.

Endo *et al.*, (2014) predijeron dos posibles sitios de unión de miR-1290 a la región 3'UTR de NAT1. Por inmunohistoquímica determinaron que miR-1290 se dirige en forma selectiva o regula la actividad de arilamina NAT1, uniéndose a uno de los sitios que habían sido propuestos por medio de bioinformática, disminuyen su expresión, resultando estar implicado en vías de generación de cáncer, además de ser utilizado como marcador de pronóstico en cáncer de mama.

Las alteraciones genéticas y epigenéticas pueden llevar a modificaciones en el metabolismo y función celular, alterando diversos parámetros hematológicos, bioquímicos y enzimáticos de los pacientes con LLA. La Biometría hemática es el primer examen que ofrece un diagnóstico presuntivo de LLA al existir variaciones en sus parámetros y es apoyo para el médico al permitir conocer el progreso en tratamiento. Salguero-Barriga, (2016) comparó los parámetros de la biometría hemática antes y después del tratamiento de quimioterapia en pacientes con LLA. Los parámetros alterados en la biometría hemática observados fueron: disminución de los valores del hematocrito, hemoglobina, leucocitos y plaquetas. El 80% de los pacientes incrementó sus valores de la biometría hemática a rangos normales, sugiriendo dichos parámetros pueden ser utilizados para conocer la eficacia del tratamiento.

Para evaluar los perfiles de distintos miRNAs se utiliza RT-qPCR. Sin embargo, la búsqueda de controles endógenos apropiados para la normalización del proceso, resulta ser importante para controlar las variaciones entre una muestra y otra (Vandesompele et al., 2002) Aunque no existe un consenso acerca de los genes de referencia para la normalización de miRNAs en circulación, diversos estudios han reportado que la expresión de miR-16-5p parece ser invariable a lo largo de un gran número de muestras, siendo el control endógeno más utilizado para miRNAs en circulación, con aplicación en cáncer de páncreas, gástrico, próstata, células renales, melanoma y neoplasias hematológicas como LLA-T.(Drobna et al., 2018). Por otro lado, Shahid *et al.* (2019) demostraron que miR-16-5p puede ser utilizado como gen de referencia confiable para la normalización de RT-qPCR en pacientes con LLA-B, debido a que su expresión no muestra diferencia significativa entre sujetos sanos y pacientes con LLA. (Shahid et al., 2019)

3. JUSTIFICACIÓN

En México, el cáncer es un problema prioritario de salud pública por su alta incidencia y tasa de mortalidad. Las estimaciones recientes señalan que anualmente se diagnostican entre 2,600 a 3,120 casos de cáncer en menores de 18 años, siendo la primera causa de mortalidad entre 5 a 14 años de edad. Se ha reportado que aproximadamente el 25% de estos casos se deben a LLA, siendo este el tipo de cáncer más frecuente en la población pediátrica. (Pérez-Saldivar, 2011)

Las alteraciones genéticas constituyen la base de la etiología de la LLA, sin embargo, se ha demostrado que no son las únicas que participan en el desarrollo de dicha enfermedad, sino que son necesarias alteraciones adicionales dentro de las que se encuentran las modificaciones epigenéticas. (Navarrete-Meneses & Pérez-Vera, 2017)

La actividad modificada de enzimas metabolizadoras de medicamentos y xenobioticos ambientales, como son la N-acetiltransferasas NAT1 y NAT2, modifican la susceptibilidad o riesgo de cáncer, además, la población pediátrica puede presentar un mayor riesgo que los adultos a una gran cantidad de tóxicos ambientales debido a una exposición diferencial, así como a una inmadurez fisiológica. La mayoría de los estudios realizados sobre NATs se han enfocado en las alteraciones genéticas que se presentan en dichas enzimas. Además de conocer la regulación genética de estas enzimas, resulta importante la caracterización de una nueva vía de regulación de NAT1: la regulación epigenética por miRNAs.

Aunque existen diversos trabajos donde se ha asociado la alteración en la expresión de miRNAs en LLA, los evaluados del presente estudio fueron seleccionados por medio de un análisis bioinformático, que además de poder estar aberrantemente expresados en LLA, son posibles reguladores del gen NAT1, cuya expresión puede estar afectada por la desregulación de dichos miRNAs. Por otro lado, la mayoría de los trabajos realizados de perfiles de expresión de miRNAs han sido realizados a partir de células mononucleares de sangre periférica, nuestro trabajo se enfoca en obtener

el perfil de expresión de miR-1290 y miR-26b a partir del plasma de los pacientes con LLA. Este análisis es muy importante debido a que los miRNAs circulantes tienen un gran potencial como biomarcadores no invasivos de diagnóstico y pronóstico, así como nuevos blancos terapéuticos que pueden beneficiar a la población pediátrica con LLA, lo que constituye una base fundamental para que en la actualidad se puedan alcanzar altas tasas de remisión de los pacientes. Finalmente, el estudio de la asociación que existe entre las variables hematológicas con los niveles de expresión relativa de los miRNAs en estudio en pacientes con LLA brinda nuevo conocimiento de la regulación epigenética en la hematopoyesis.

4. HIPÓTESIS

Los miRNAs miR-1290 y miR-26b, posibles reguladores de la expresión de NAT1, están presentes en plasma de pacientes pediátricos con LLA-B y difieren en su expresión comparándose con un grupo de sujetos control

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar los niveles de los miRNAs miR-1290 y miR-26b en plasma de pacientes pediátricos con LLA-B y determinar si existe diferencia en su expresión comparados con sujetos control.

5.2 Objetivos específicos

- Analizar las variables hematológicas, antropométricas, demográficas y clínicas en pacientes con LLA-B y sujetos control.

- Evaluar los niveles de expresión de miR-1290 y miR-26b en plasma de pacientes pediátricos con LLA-B y en sujetos control por medio de qPCR.
- Analizar la asociación que existe entre las variables hematológicas, antropométricas, demográficas y clínicas con la expresión de miR-1290 y miR-26b en pacientes pediátricos con LLA-B y sujetos control.
- Analizar la asociación que existe entre los niveles de expresión de miR-1290 y miR-26b con los niveles de expresión de NAT1 en pacientes pediátricos con LLA-B y sujetos control.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diseño metodológico

El presente trabajo es un estudio transversal.

6.2 Definición de la población

Niños menores de 18 años con diagnóstico confirmado de LLA-B provenientes del área de hemato-oncología pediátrica para el grupo de LLA y niños menores de 18 años que no presentaran ningún tipo de neoplasia para el grupo control del área de Pediatría del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.

6.2.1 Tipo de muestreo

Se llevó a cabo un muestreo probabilístico consecutivo. Las muestras de plasma fueron obtenidas a partir del trabajo previo realizado por nuestro equipo de investigación, titulado “Evaluación del estado epigenético de las N-acetiltransferasas NAT1 y NAT2 en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda”, en un periodo comprendido entre el 2018-2019.

6.2.2 Tamaño de la muestra

No se calculó el tamaño de la muestra, el número de participantes fue determinado en base a las muestras congeladas disponibles, obteniendo:

un grupo de pacientes con LLA-B con una $n=17$ y

un grupo de sujetos control con una $n=17$.

6.2.3 Lugar de realización

Departamento de Pediatría y Hemato-oncología pediátrica del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”, San Luis Potosí, S.L.P. que acudieron a consulta en un periodo comprendido entre el 2018-2019.

6.3 Variables de estudio:

- Expresión relativa de miR-1290 y miR-26b
- Variables hematológicas
- Variables antropométricas
- Variables demográficas

En el anexo 1 se muestra la tabla de categorización de variables.

6.4 Criterios de selección

6.4.1 Criterios de inclusión grupo control

- Niños o niñas de 0 a 17 años de edad del Departamento de Pediatría del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”
- Niños o niñas de 0 a 17 años de edad que no presenten ningún tipo de neoplasia
- Contar con la carta de consentimiento informado firmado por el padre o tutor legal, así como la carta de asentimiento informado firmada por niños de 12 a 17 años.

6.4.2 Criterios de no inclusión grupo control

- Pacientes que, por su estado de gravedad, no puedan ser sometidos a la toma de muestra
- Pacientes que presenten cáncer.

6.4.3 Criterios de inclusión grupo de pacientes con LLA

- Niños o niñas de menores de 18 años de edad con diagnóstico confirmado de Leucemia Linfoblástica Aguda
- Pacientes del departamento de Hemato-oncología Pediátrica del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”
- Carta de consentimiento informado firmada por el padre o tutor legal, así como la carta de asentimiento informado firmada por el menor de 12 a 17 años de edad.

6.4.4 Criterios de no inclusión grupo de pacientes con LLA

- Pacientes que, por su gravedad, no puedan ser sometidos a la toma de muestra
- Pacientes que presenten leucemia bifenotípica.

6.4.5 Criterios de eliminación grupo control y grupo de pacientes con LLA

- Retiro voluntario del estudio.

6.5 Selección de miRNAs en estudio

Como parte del trabajo de tesis de Zavala-Reyes, D. se realizó un análisis bioinformático para la búsqueda y selección de miRNAs que reportaran como blanco de regulación a NAT1 por medio de herramientas como miRanda, TargetScan, miRTarBase, Argonauta y DianaTools. En base a miRTarBase, se seleccionó a miR-26b como potencial regulador de NAT1, dicha herramienta tiene la característica que los genes blanco son soportados experimentalmente por medio de microarreglos. Por otra parte, el control endógeno, así como de miR-1290 fueron seleccionados en base a estudios realizados previamente encontrados en la bibliografía.

6.6 Análisis descriptivo de los grupos de estudio

A partir de la información obtenida de la base de datos “Evaluación del estado epigenético de las N-acetiltransferasas NAT1 y NAT2 en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda” y en base a las muestras seleccionadas para ser analizadas, se llevó a cabo un análisis descriptivo de las características demográficas y antropométricas en pacientes con LLA y grupo control. De igual manera, se compararon las variables hematológicas entre ambos grupos.

6.7 Obtención de muestras sanguíneas

Las muestras se obtuvieron de pacientes con diagnóstico confirmado de Leucemia linfoblástica aguda subtipo B (LLA-B), que acudieron al área de hemato-oncología pediátrica y de sujetos control provenientes del área de pediatría del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” en un periodo comprendido entre 2018-2019 y que contaran con la carta de consentimiento informado, como parte del proyecto de nuestro equipo de investigación, titulado “Evaluación del estado epigenético de las N-acetiltransferasas NAT1 y NAT2 en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda”. Se les extrajo a los participantes sangre venosa periférica al momento de la canalización realizada por el médico en tubos Vacutainer de 6 mL con EDTA para el análisis hematológico y para la evaluación de miRNAs circulantes. El plasma fue separado por medio de centrifugación, se hicieron alícuotas en tubos eppendorf de 1.5 mL. Las muestras de plasma se almacenaron a -80°C en un Ultracongelador Ultra-Low freezer (So-Low) hasta su uso. Las muestras de los pacientes y los controles analizadas en este estudio, fueron seleccionadas en base al número de alícuotas de plasma congelado disponibles y a la información disponible en la base de datos.

6.8 Extracción de ARN

Para evaluar la expresión relativa de miR-1290 y miR-26b, el RNA total se extrajo utilizando el método de TRIzol (Introvigen), a partir de 17 muestras de plasma de pacientes con LLA-B y de 17 sujetos sanos, las cuales se encontraban congeladas a -80°C. La concentración del ARN se determinó mediante medición espectrofotométrica empleando el equipo Epoch (BioTek) calculada a través de la absorbancia a 260 nm; la pureza del ARN se obtuvo mediante la relación A260/280.

6.9 Optimización de RT-qPCR

Los oligonucleótidos fueron diseñados por parte de la empresa T4 Oligo para evaluar la expresión relativa de los miRNAs en estudio miR-1290, miR-26b y miR-16-5p por medio de RT-qPCR. La secuencia de los genes candidato fueron obtenidos de la base de datos de miRNAs (www.mirbase.org). Los detalles de las secuencias de los oligos y sondas, tipo y numero de acceso se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.- Primers de los miRNAs evaluados con su tipo, secuencia y número de acceso

miRNA	Tipo	Oligo	Secuencia	Número de acceso
miR-16-5p	hsa-miRNA	Primer Fw	5'-CGTTGTATAGCAGCACGTA-3'	MIMAT0000069
		Sonda	5'-GTGCTAGACGACACCGCCAATATT-3'	
miR-1290	hsa-miRNA	Primer Fw	5'-CATGCAGTATGGATTTTGGGA-3'	MIMAT0005880
		Sonda	5'-CTGTGCTAGACGACACTCCCTGA-3'	
miR-26b	hsa-miRNA	Primer Fw	5'- CGAGCAGTATTCAAGTAATTC-3'	MIMAT0000083
		Sonda	5'-TGTGCTAGACGACACACCTATCCT-3'	

Para establecer las condiciones óptimas de la RT-qPCR, se probaron distintas concentraciones de primers y sondas para cada miRNA. A partir de muestras de plasma fresco de sujetos sanos se llevó a cabo la extracción de RNA utilizando el

método de TRIzol (Introvigen), a partir de este se realizó una RT para la obtención de DNAc utilizando el Kit “TaqMan MicroRNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems, Foster City, CA), preparando el mix que se muestra en la Tabla 3, siguiendo el protocolo de amplificación mostrado en la Tabla 4.

Tabla 3.- Reactivos de RT para la obtención de DNAc.

Reactivo	[Stock]	Volumen/ Rxn (μL)
dNTP mix	100 mM	0.15
MultiScribeRT	50 U/μL	1.0
RT Buffer	10X	1.50
Inhibidor de RNasas	20 U/μL	0.20
Agua libre de nucleasas	-	4.15
RNA (300ng)	-	5

Tabla 4.- Programa de RT para la obtención de DNAc

Temperatura	Tiempo
16°C	30 min
42°C	30 min
80°C	5 min
4°C	∞

Con el DNAc obtenido, se probaron distintas concentraciones del mismo (300ng, 400ng, 500ng) así como diferentes concentraciones del Primer forward, primer reverse y sonda de miR-1290, miR-26b y miR-16-5p (Tabla 5). La expresión de los miRNAs se determinó empleando el sistema de detección BIO-RAD CFX96 (BioRad Laboratories, Hercules, EUA), con el uso de qPCR ProbesMaster (Jena Bioscience). Las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 6. Finalmente, se evaluó la expresión de los miRNAs de forma individual, de forma dúplex (miR-1290/miR-26b; miR-1290/miR-16-5p; miR-26b/miR-16-5p) y de forma triplex (miR-1290/miR-26b/miR-16-5p) de tal manera que no existiera la formación de dímeros o interacciones entre los primers o las sondas, que afectaran los niveles de expresión de los miRNAs.

Tabla 5.- Concentraciones utilizadas de primers y sonda de miR-16-5p, miR-1290 y miR-26b para optimización de RT-qPCR

	miR-16-5p (μL)			miR-1290 (μL)			miR-26b (μL)		
Primer Fw (10nM)	0.5	0.5	0.6	0.2	0.3	0.5	0.2	0.3	0.5
Primer Rv (10nM)	0.5	0.5	0.6	0.2	0.3	0.5	0.2	0.3	0.5
Sonda (10nM)	0.4	0.6	0.4	0.3	0.2	0.4	0.3	0.2	0.4

Tabla 6.- Condiciones de amplificación de la qPCR

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial y activación de Pol	95°C	3:00	1X
Desnaturalización	95°C	0:15	50X
Alineación y elongación	60°C	0:40	50X

6.10 Síntesis del DNA complementario (DNAc)

Para la síntesis de DNAc, 300 ng de RNA total se transcribieron de manera inversa empleando primers de RT específicos para miR-1290, miR-26b y miR-16-5p (stem loops T4 Oligo, Irapuato, Gto) utilizando el Kit “TaqMan MicroRNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems, Foster City, CA) siguiendo las instrucciones de manufactura. Se realizó una RT dúplex de miR-1290/miR-26b para realizar la síntesis simultánea del DNAc de dichos miRNAs, y una RT individual de miR-16-5p. Se preparó un mix con los reactivos y las cantidades descritas en la Tabla 3, al cual se le agregaron 5 μ L de ARN (300 ng) y 0.75 μ L de los primers específicos para cada miRNA. El termociclador C100 Touch Thermal Cycler fue utilizado para llevar a cabo la reacción. El DNAc fue almacenado a -20°C hasta ser utilizado. El programa de RT utilizado se muestra en la Tabla 4.

6.11 PCR tiempo real (qPCR)

Las reacciones de qPCR se realizaron por duplicado incluyendo un control negativo sin templado (NTC) en el sistema de detección BIO-RAD CFX96 (BioRad Laboratories, Hercules, EUA), con el uso de qPCR ProbesMaster (Jena Bioscience) y con primers específicos para cada miRNA que se describen en la tabla 2. Se establecieron las condiciones óptimas de amplificación y de concentraciones de primers específicos para cada reacción. Se realizó una qPCR dúplex para la cuantificación simultánea de miR-1290 y miR-26b y una qPCR individual para la cuantificación de miR-16-5p, llevando a cabo la preparación de 1 mix para cada reacción, las condiciones óptimas seleccionadas previamente se muestran en la Tabla 7. La condición de la amplificación se realizó acorde al perfil de rampa que se encuentra en la Tabla 6. La expresión relativa de los miRNAs miR-1290 y miR-26b se normalizó a la expresión del control endógeno miR-16-5p. La expresión relativa de los miRNAs se determinó con el método $2^{-\Delta CT}$.

Tabla 7.- Concentraciones óptimas de reactivos para la evaluación de miRNAs por medio de qPCR individual y dúplex

Componente	Dúplex		Individual
	miR-1290/miR-26b		miR-16-5p
	1X (μL)		1X (μL)
Master mix	7.5		5
	miR-1290	miR-26b	miR-16-5p
Primer Fw (10nM)	0.5	0.5	0.5
Primer Rv universal (10nM)	0.5	0.5	0.5
Sonda (10nM)	0.4	0.4	0.6
MgCl ₂ (50 Mm)	0.45		-----
H ₂ O	2.25		1.4
DNAc (150ng/μL)	2		2
Volumen final	15		10

Se preparó un mix con las concentraciones óptimas de reactivos para evaluar en forma de qPCR dúplex miR-1290/miR-26b y otro mix para la evaluación individual de miR-16-5p.

6.12 Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad v.5. La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba Shapiro Wilk ($n < 50$). Las variables hematológicas, antropométricas y demográficas fueron analizadas por la prueba “t-student” para datos paramétricos o “U de Mann Whitney” en datos no paramétricos, para comparar ambos grupos de estudio.

La significancia en la expresión de miRNAs se evaluó utilizando la prueba estadística “U de Mann Whitney”.

Se analizó la asociación entre las variables explicativas (valor absoluto de NAT1, glóbulos blancos, linfocitos, eritrocitos y hemoglobina) con la expresión relativa de miR-1290, tanto para el grupo LLA como para grupo control, por medio de un análisis del coeficiente de correlación de Spearman. En el caso de variables categóricas se evaluó la asociación con la prueba exacta de Fisher y cálculo del odds ratio (OR) con un intervalo de confianza al 95%. Una $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

6.13 Consideraciones éticas

Se contó con el consentimiento informado de los padres o tutores de los menores, informándoles acerca de los puntos importantes del estudio antes de llevar a cabo la toma de muestra. Se aseguró la confidencialidad de los datos obtenidos y se llevó a cabo un manejo responsable de los datos disponibles de cada paciente de la base de datos del proyecto “Evaluación del estado epigenético de las N-acetiltransferasas NAT1 y NAT2 en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda”.

Este proyecto cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” con un número de registro 25-17, así como de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP CEID2017103-S.

7. RESULTADOS

7.1 Características de los grupos de estudio

En el presente estudio se incluyeron 17 pacientes con LLA y 17 controles con una media de edad de 9.2 ± 3.6 años para los pacientes con LLA y de 8.9 ± 3.2 años para el grupo control. La prueba de t-student indicó que no existen diferencias en la media del peso, IMC y estatura en los pacientes con LLA, comparado con el grupo control, lo que indica una homogeneidad en las características demográficas y antropométricas en los sujetos de ambos grupos de estudio. (Tabla 8)

Tabla 8.- Características demográficas y antropométricas de los grupos de estudio

Variables	Pacientes LLA n=17	Grupo control n=17	p^b
Demográficas			
Edad (años) ^a	9.2 ± 3.66	8.94 ± 3.25	0.81
Sexo	10 Hombres 7 mujeres	9 hombres 8 mujeres	1.0
Antropométricas			
Peso (kg) ^a	37.33 ± 17.36	37.14 ± 20.37 (15-82)	0.97
Estatura (m) ^a	1.32 ± 0.22	1.36 ± 0.22	0.79
IMC (kg/m^2) ^a	20.32 ± 5.08 Bajo peso 1 (5.8%) Normopeso 8 (47.0%) Sobrepeso 2 (11.76%) Obesidad 6 (35.3%)	19.07 ± 5.00 Bajo peso 3 (17.6%) Normopeso 8 (47.0%) Sobrepeso 1 (5.8%) Obesidad 5 (29.4%)	0.49

^aDatos presentados media $\pm$ DE

^bt-Student, una $p < 0.05$ es considerado estadísticamente significativo

Por otra parte, en el grupo de pacientes pediátricos con LLA-B el 59% eran hombres, la media de la edad es de 9.2 años y el 88.2% de los pacientes se encontraban en etapa del tratamiento de mantenimiento, el 17.6% de los pacientes mostraron recaída a medula ósea y otro 17.6% tuvieron recaída a SNC. Se presentaron 6 defunciones (35.3%), resaltando que todos eran hombres. (Tabla 9)

Tabla 9.- Análisis descriptivo de pacientes pediátricos con LLA

Variable	Categoría	n	%
Sexo	Hombre	10	59
	Mujer	7	41
Etapas del tratamiento	Consolidación	1	5.9
	Mantenimiento	15	88.2
	Reinducción	1	5.9
Riesgo	Alto riesgo	16	94.1
	Riesgo habitual	1	5.9
Recaídas	Recaída a MO	3	17.6
	Recaída a SNC	3	17.6
Enfermedades concomitantes	Síndrome de Down	1	5.9
	Síndrome de Soto	1	5.9
Región del estado de SLP	Zona Altiplano	4	23.5
	Zona centro	9	52.9
	Zona Huasteca	3	17.6
	Zona Media	1	5.9
Defunción		6	35.3

Datos presentados en n y porcentaje

MO: Médula ósea

SNC: Sistema nervioso central

Se evaluaron las variables hematológicas en el grupo de pacientes con LLA y se compararon con el grupo control, encontrando una disminución significativa en los valores de glóbulos blancos en los pacientes con LLA ($\bar{x}=4.3\pm1.05$ k/ μ L) comparado con el grupo control ($p<0.0001$), de igual manera se observa una disminución significativa en los valores de linfocitos ($\bar{x}=1.41\pm1.05$) y eritrocitos ($\bar{x}=3.8\pm0.71$ M/ μ L), ($p=0.0022$) (Fig. 1.)

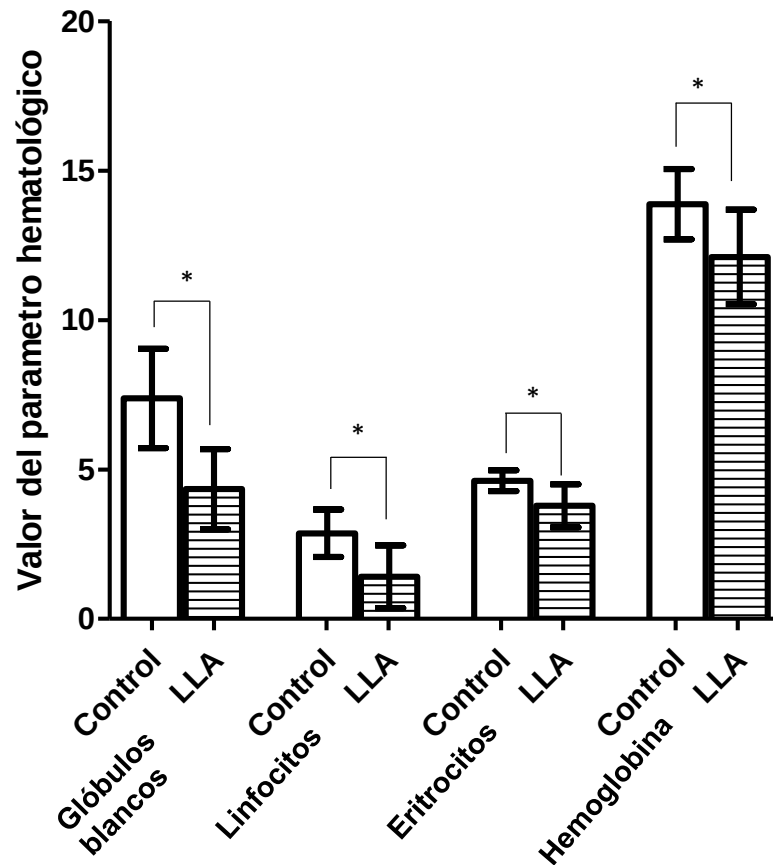


Fig. 1.- Parámetros hematológicos que muestran una disminución significativa en sus valores en pacientes con LLA

Se compararon ambos grupos con t student, datos presentados como la media±DE. * $p<0.05$ estadísticamente significativo

Glóbulos blancos (k/μL), Linfocitos (k/μL), Eritrocitos (M/μL), Hemoglobina (g/dL)

Los valores de plaquetas y hematocrito no mostraron diferencias significativas en la media de los valores entre ambos grupos y dichos valores se encuentran dentro de los rangos normales. En cuanto a los índices eritrocitarios, así como valores de hemoglobina existe una diferencia significativa en la media de dichos valores en pacientes con LLA con respecto al grupo control ($p<0.05$), sin embargo, dichos valores se encuentran dentro de los rangos normales en ambos grupos. (Tabla 10).

Tabla 10.- Características clínicas de los grupos de estudio

Variables Hematológicas	Pacientes LLA n=12			Grupo control n=17			p^a
	Media	Mediana	Rango (min-max)	Media	Mediana	Rango (min-max)	
Glóbulos blancos (k/ μ L)	4.34	4.40	1.00-7.20	7.37	7.40	5.20-10.90	<0.0001*
Linfocitos (k/ μ L)*	1.41	1.22	0.51-4.60	2.86	2.70	1.35-4.10	0.0003*
MID (k/ μ L)	0.54	0.58	0.22-0.76	0.63	0.60	0.30-1.7	0.75
Neutrófilos (k/ μ L)*	2.61	2.28	1.53-4.27	3.88	3.70	2.00-8.00	0.00849*
Eritrocitos (M/ μ L)	3.81	4.01	2.57-4.81	4.62	4.65	3.94-5.36	0.0022*
Hemoglobina (g/dL)	12.11	11.90	9.50-14.80	13.88	14.00	11.0-15.6	0.0018*
Hematocrito (%)	36.96	38.55	28.3-44.5	40.36	39.80	33.7-49.9	0.0604
MCV (fL)	98.63	97.20	90.6-112.0	86.09	84.60	81.9-94.1	<0.0001*
MCH (pg)	32.41	31.50	27.4-36.9	30.01	30.20	27.6-32.5	0.0197*
MCHC (g/dL)	32.97	33.10	29.7-35.1	34.88	34.90	32.5-37.7	0.0008*
RDW	16.88	16.75	13.3-21.9	11.85	11.70	11.2-13.5	<0.0001*
Plaquetas	272.8	284.0	113.0-387.0	326.6	348.0	179.0-429.0	0.0911

^a U Mann-Whitney para datos no paramétricos; t-student para datos paramétricos

*p<0.05 estadísticamente significativo

MCV: Volumen corpuscular medio; MCH: concentración media de hemoglobina; MCHC: Concentración de hemoglobina corpuscular media; RDW: ancho de distribución eritrocitaria

7.2 Evaluación de miR-16-5p como control endógeno

La RT-qPCR es considerado el estándar de oro para la cuantificación de la expresión de genes por su sensibilidad y reproducibilidad, sin embargo, se requiere de la selección de un control endógeno apropiado que muestre estabilidad y abundancia a lo largo de las muestras analizadas independientemente de su tejido de origen. Se utilizó miR-16-5p como control endógeno para evaluar la expresión de miR-1290 y miR-26b, mostrando una media de Ct 28.8 ± 2.3 y un CV del 8.57% para el grupo control y una media de Ct de 27.21 ± 3.1 con un CV de 11.57% para LLA. En la Fig. 2. se muestra la media de los valores de Ct de miR-16-5p en plasma de pacientes con LLA y controles, donde no se observó diferencia significativa. ($p=0.72$)

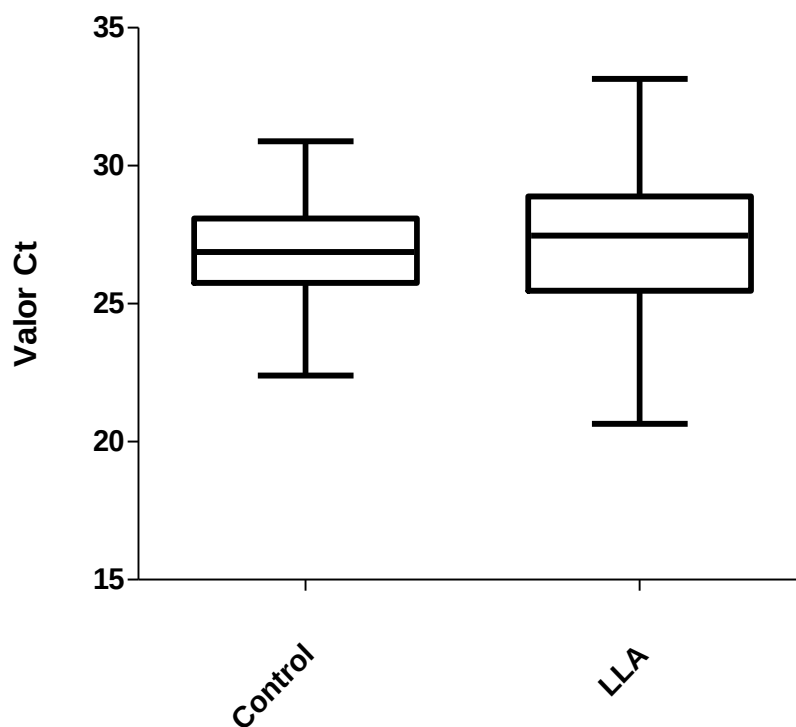


Fig. 2.- Evaluación de miR-16-5p como control endógeno

Se evaluó la expresión de miR-16-5p por medio de RT-qPCR en ambos grupos. Las cajas representan la media y la desviación estándar y los bigotes representan el mínimo y el máximo. No existe diferencia en la media del valor de Ct de miR-16-5p entre ambos grupos ($p=0.72$)

7.3 Expresión relativa de miR-1290 y miR-26b circulantes

La expresión relativa de miR-1290 y miR-26b fue evaluada en plasma de 17 pacientes con LLA y 17 sujetos control, empleando como control endógeno a miR-16-5p. La expresión relativa fue calculada a partir de los Ct de ambos grupos con el método de $2^{-\Delta Ct}$ donde:

$$\Delta Ct = Ct \text{ miRNA evaluado} - Ct \text{ control endógeno}$$

$$\text{miRNA evaluado} = \text{miR} - 1290 \text{ o } \text{miR} - 26b$$

$$\text{Control endógeno} = \text{miR} - 16 - 5p$$

La prueba U de Mann Whitney fue empleada para determinar diferencias en la expresión de los miRNAs evaluados, entre ambos grupos. (Tabla 11)

Tabla 11.- Expresión relativa de miR-1290 y miR-26b

miRNA	Pacientes LLA n=17	Grupo control n=17	<i>p</i> ^a
	Expresión relativa	Expresión relativa	
miR-1290	0.057 ± 0.192	0.020 ± 0.059	0.067
miR-26b	0.017 ± 0.035	0.010 ± 0.035	0.43

Se determinó la expresión relativa de miR-1290 y miR-26b empleando el método $2^{-\Delta Ct}$.

Datos presentados como mediana±RIQ

. ^a U de Mann Whitney. Una $p < 0.05$ es considerado estadísticamente significativa

Se encontró una diferencia marginalmente significativa en los niveles de expresión de miR-1290 entre ambos grupos ($p=0.067$), observándose una tendencia a una mayor expresión de dicho miRNA en los pacientes con LLA comparado con el grupo control. La diferencia en la expresión de miR-1290 en pacientes con LLA comparado con el grupo control es de 3.5 veces. (Fig. 3)

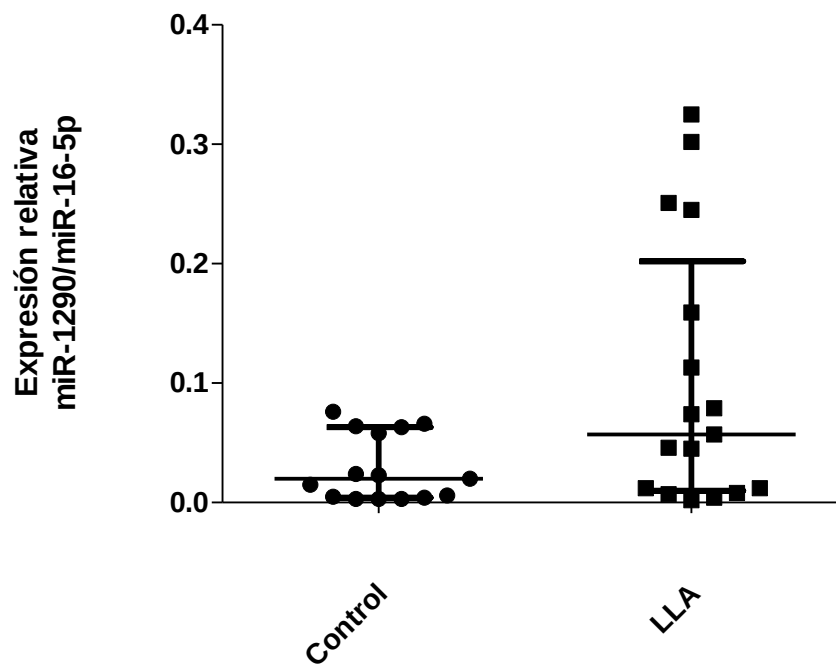


Fig. 3.- Expresión relativa de miR-1290 en grupo control y pacientes con LLA
 Datos presentados como mediana $\pm$ RIQ. Tendencia al incremento en la expresión de miR-1290 en pacientes con LLA en comparación con el grupo control. Diferencia marginalmente significativa $p=0.067$

Por otra parte, la razón de cambio o diferencia en la expresión de miR-26b en pacientes con LLA comparado con el grupo control es de 1.6 veces, sin embargo, no existe una diferencia estadísticamente significativa en la mediana de la expresión relativa de miR-26b en pacientes con LLA en comparación con el grupo control ($p=0.43$). (Fig. 4)

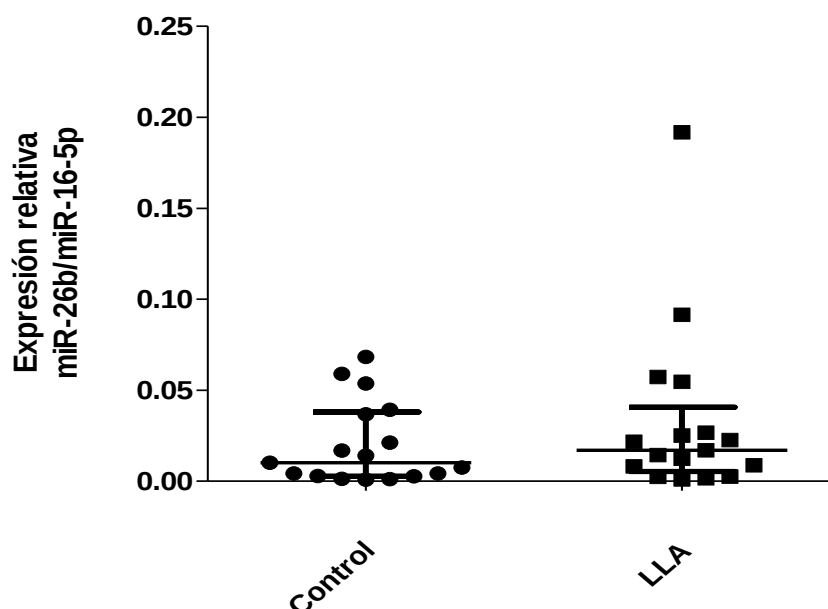


Fig. 4.- Expresión relativa de miR-26b en grupo control y pacientes con LLA. Datos presentados como mediana $\pm$ RIQ. No hay diferencia significativa en la expresión de miR-26b entre ambos grupos $p=0.43$

7.4. Estratificación de pacientes y controles y la expresión relativa de miR-1290 y miR-26b circulantes

Con el fin de conocer si la expresión de miR-1290 y miR-26b mostraba diferencias determinadas por las variables antropométricas, demográficas o clínicas, se estratificó a los pacientes y controles en subgrupos por sexo, IMC y recaída. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de los miRNAs por sexo o IMC en el grupo control (Tabla 12); en el grupo de mujeres con LLA se encontró una diferencia significativa en la expresión de miR-1290 comparada con el grupo control, con una razón de cambio de 4.5 veces ($p=0.009$) (Fig. 5)

Tabla 12.- Expresión relativa de miR-1290 y miR-26b en subgrupos

		miR-1290						miR-26b					
		Control			LLA			Control			LLA		
Variable	Categoría	Mediana	Mín-Max	<i>p</i>	Mediana	Mín-max	<i>p</i>	Mediana	Mín-Max	<i>p</i>	Mediana	Mín-max	<i>p</i>
Sexo	Hombre	0.024	0.003-0.34	0.73	0.028	0.002-0.325	0.09	0.004	0.0011-0.059	0.31	0.013	0.001-0.192	0.49
	Mujer	0.021	0.003-0.006		0.113	0.012-0.302		0.019	0.0009-0.0684		0.022	0.002-0.092	
IMC	Normopeso	0.058	0.003-0.34	0.36	0.045	0.004-0.250	0.47	0.010	0.0013-0.590	0.61	0.012	0.002-0.057	0.5
	Sobrepeso y obesidad	0.019	0.003-0.060		0.085	0.002-0.325		0.009	0.0009-0.068		0.023	0.001-0.192	
Recaída	Recaída	N/A	N/A	N/A	0.182	0.007-0.325	0.11	N/A	N/A	N/A	0.024	0.002-0.092	0.36
	Sin recaída	N/A	N/A	N/A	0.046	0.002-0.245		N/A	N/A	N/A	0.012	0.001-0.192	

N/A: No aplicable

La expresión relativa en pacientes y controles fue comparada entre las categorías de sexo, IMC y recaída empleando la prueba U de Mann Whitney. * $p < 0.05$ estadísticamente significativa.

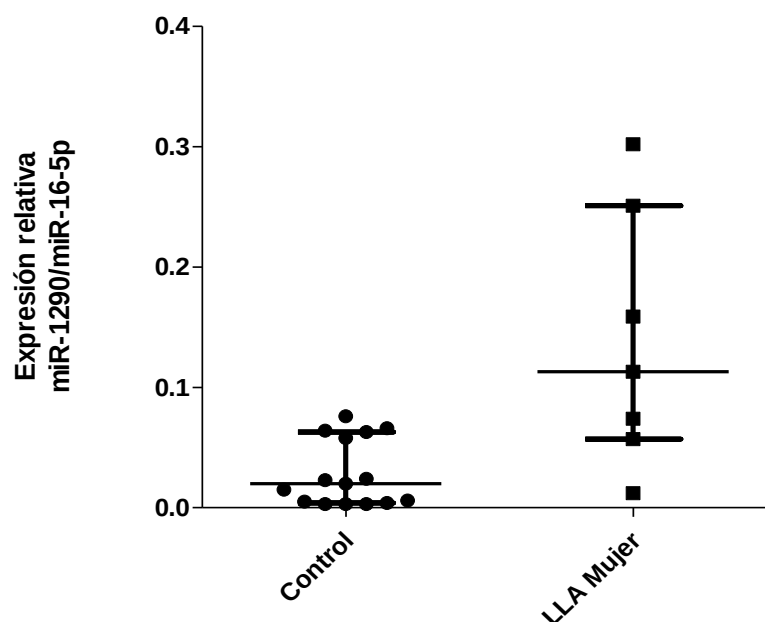


Fig. 5.- Expresión relativa de miR-1290 en mujeres con LLA.
miR-1290 muestra una mayor expresión en pacientes mujeres con LLA en comparación con el grupo control ($p=0.009$) Datos presentados como mediana $\pm$ RIQ.

Se analizó la asociación entre la sobreexpresión de miR-1290 y el sexo femenino, encontrando que las mujeres con LLA tienen 5.3 veces mayor probabilidad de mostrar sobreexpresión de miR-1290 que los hombres con LLA, sin embargo, esta asociación no es estadísticamente significativa $p=0.16$ (Tabla 13)

Tabla 13.- Prueba exacta de Fisher y análisis de la sobreexpresión de miR-1290 y sexo en pacientes con LLA

	Sobreexpresión n(%)	No sobreexpresión n(%)	<i>p</i>	OR (IC 95%)
Mujer	4 (66.6)	3 (27.3)	0.16	5.3 (0.61-46.2)
Hombre	2(33.3)	8 (72.7)		

^aPrueba exacta de Fisher

OR: odds ratio

IC: Intervalo de confianza

7.5 Expresión relativa de miR-1290 y miR-26b en pacientes con recaída

Los pacientes con LLA fueron estratificados en subgrupos con base a la recaída a médula ósea o sistema nervioso central, observando que aquellos pacientes que mostraban mayor expresión de miR-1290 pertenecían al grupo de recaída. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la de la expresión relativa de miR-1290 en pacientes con recaída en comparación con el grupo control, con una razón de cambio de 1.5 veces ($p=0.017$) (Fig. 6)

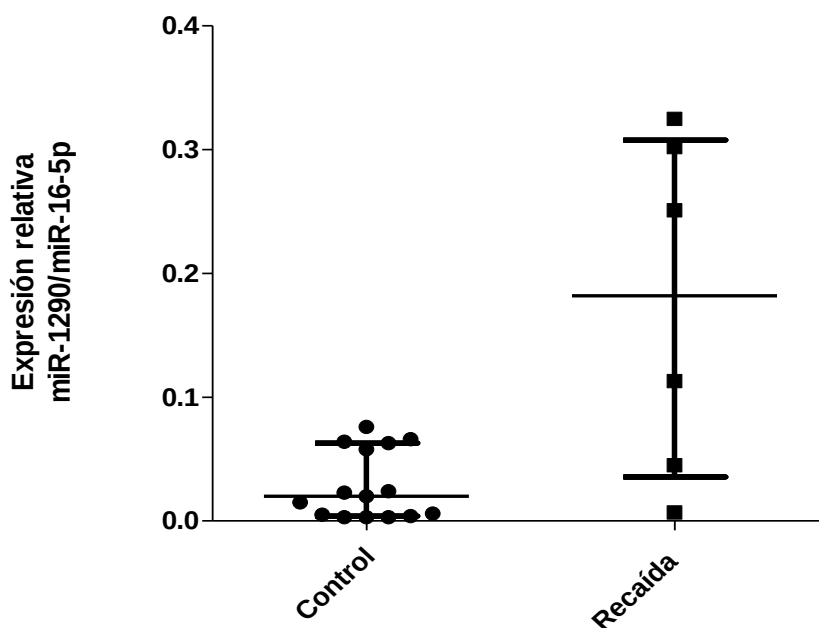


Fig. 6 Expresión relativa de miR-1290 en pacientes con recaída
Diferencia significativa en la expresión de miR-1290 en los pacientes con recaída comparada con el grupo control ($p=0.017$)

Posteriormente, se analizó la asociación entre la sobreexpresión de miR-1290 y el riesgo de mostrar recaída en pacientes con LLA. En la Tabla 14 se muestran dichos resultados, no hay asociación significativa entre la sobreexpresión de miR-1290 y la probabilidad de mostrar recaída en pacientes con LLA. ($p=0.109$)

Tabla 14.- Prueba exacta de Fisher y análisis de la sobreexpresión de miR-1290 y recaída en LLA

	Recaída n(%)	No recaída n(%)	p^a	OR (IC 95%)
Sobreexpresión	4 (66.6)	2 (18.1)	0.109	9.0 (0.9-88.5)
No sobreexpresión	2 (33.3)	9 (81.9)		

^aPrueba exacta de Fisher

OR: odds ratio

IC: Intervalo de confianza

7.6 Asociación de miR-1290 con NAT1 y variables hematológicas

Con el fin de evaluar la asociación entre las variables explicativas (valor absoluto de NAT1, glóbulos blancos, linfocitos, eritrocitos y hemoglobina) con la expresión relativa de miR-1290, tanto para el grupo de pacientes con LLA como para el grupo control, se empleó el análisis del coeficiente de correlación de Spearman y se consideraron estadísticamente significativas aquellas variables con valores de $p < 0.05$.

A partir de la base de datos del estudio “Evaluación del estado epigenético de las N-acetiltransferasas NAT1 y NAT2 en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda” se obtuvieron los valores absolutos y porcentajes de expresión de NAT1 tanto en pacientes con LLA como en el grupo control. En dicho estudio, se encontró una disminución estadísticamente significativa en el valor absoluto de NAT1 en pacientes con LLA en comparación con el grupo control ($p=0.0019$), de igual manera, se encontró una disminución de la actividad de NAT1 en LLA ($p=0.0011$) por lo que resultó de interés evaluar su asociación con la expresión relativa de miR-1290.

No se encontraron asociaciones significativas entre la expresión relativa de miR-1290 con el valor absoluto de NAT1 en linfocitos totales en ambos grupos de estudio. (Fig. 7). La asociación entre la expresión de miR-1290 fue evaluada también con los valores de NAT1 en la subpoblación de linfocitos CD3+, no encontrando una correlación lineal significativa entre la expresión relativa de miR-1290 con el valor absoluto de NAT1 en linfocitos CD3+ ($r=0.20$, $p=0.51$).

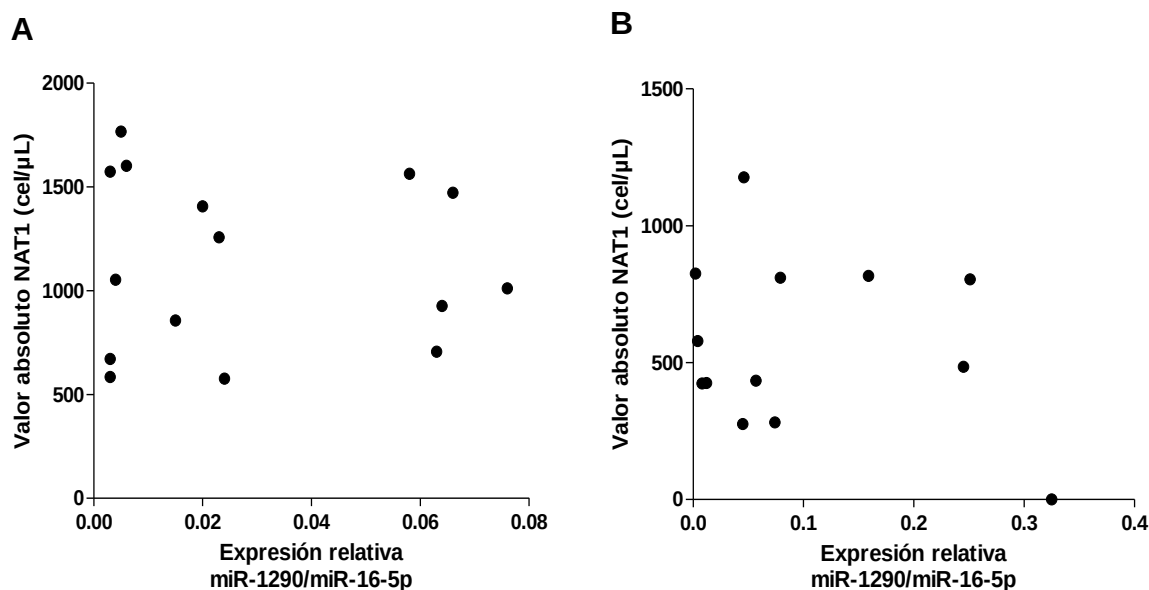


Fig. 7.- Asociación entre la expresión relativa de miR-1290 y el valor absoluto de NAT1

A) Correlación de Spearman para el grupo control. No se encontró una correlación lineal significativa ($r=-0.03$, $p=0.89$) B) Correlación de Spearman en pacientes con LLA, no encontrando correlación lineal significativa ($r=-0.13$, $p=0.65$)

No se encontró correlación significativa entre la expresión relativa de miR-1290 con glóbulos blancos, eritrocitos y hemoglobina en pacientes con LLA ni en el grupo control (Tabla 15). En cuanto a los valores de linfocitos se encontró una asociación negativa, moderada y significativa con una $r=-0.59$ en grupo control, lo que indica que a mayor expresión de miR-1290 hay menor número de linfocitos en sujetos control (Fig. 8).

Tabla 15.- Correlaciones de Spearman entre la expresión relativa de miR-1290 y las variables hematológicas

Variable hematológica	LLA		Control	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Glóbulos blancos	-0.18	0.48	0.35	0.19
Linfocitos	0.28	0.37	-0.59	0.02*
Eritrocitos	0.12	0.69	-0.24	0.38
Hemoglobina	0.11	0.72	-0.44	0.09

r = rho de Spearman

* $p<0.05$ correlación estadísticamente significativa

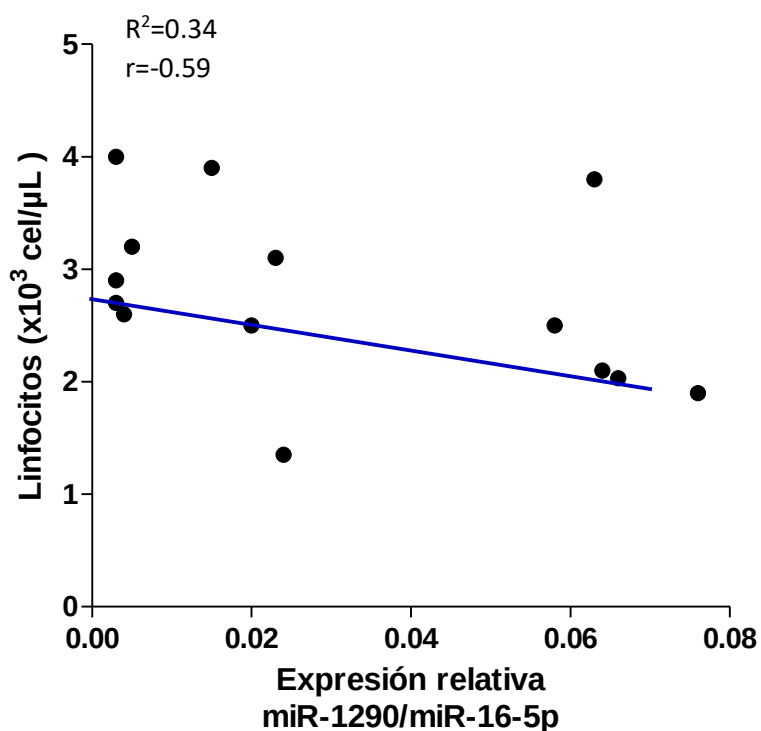


Fig. 8.- Correlación de Spearman entre la expresión relativa de miR-1290 y los valores de linfocitos en el grupo control. El coeficiente de correlación es significativamente distinto a cero, existe una asociación negativa moderada y significativa entre los niveles de expresión de miR-1290 y los valores de linfocitos en el grupo control ($r=-0.59$, $p=0.02$)

8. DISCUSIÓN

La leucemia linfoblástica aguda es el tipo de cáncer más común en niños. A pesar de que existe gran cantidad de estudios que han contribuido a mejorar la sobrevida en pacientes con leucemia, poco se sabe acerca de los acontecimientos que conducen al inicio y progresión de dicha enfermedad. Los microRNAs (miRNAs) son reconocidos como una clase de moléculas pequeñas de RNA no codificantes, que desempeñan un rol importante en la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional. (Lu

et al., 2005). Con el objetivo de evaluar un mecanismo de regulación epigenética de la expresión de NAT1 y su posible implicación en la generación y progresión de LLA, se evaluó la expresión relativa de miR-1290 y miR-26b en plasma de pacientes pediátricos con LLA y se comparó con un grupo control, encontrando una tendencia a una mayor expresión de miR-1290 en pacientes con LLA, mientras que la expresión de miR-26b no mostró diferencia significativa. Los valores de glóbulos blancos, linfocitos, eritrocitos y hemoglobina se encontraban disminuidos en pacientes con LLA. Finalmente, una correlación negativa fue encontrada entre los niveles de expresión de miR-1290 y los valores de linfocitos en sujetos control.

Los miRNAs regulan una variedad de procesos celulares incluyendo crecimiento, diferenciación, proliferación, apoptosis, así como la transformación maligna. Debido a esto, no es sorprendente que la expresión aberrante de miRNAs esté implicada en ciertos estados de enfermedad incluido el cáncer. Estudios recientes han ampliado la comprensión de cómo las alteraciones en la expresión de miRNAs pueden contribuir al desarrollo de un fenotipo leucémico, convirtiéndose en potenciales biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y posibles blancos terapéuticos. (McManus, 2003)

A pesar de que los miRNAs circulantes en suero o plasma son potenciales biomarcadores no invasivos en cáncer, existen ciertas limitaciones en su estudio; una de ellas es el hecho de que algunos miRNAs pueden encontrarse en bajas concentraciones en sangre y la falta de normalizadores endógenos fiables dificulta la cuantificación específica de miRNAs circulantes. Por tal razón, resulta indispensable la estandarización o normalización de protocolos para el estudio de miRNAs circulantes como nuevos biomarcadores. (Etheridge et al., 2011) La RT-qPCR es considerado el estándar de oro para la evaluación de perfiles de expresión de miRNAs por su alta sensibilidad y reproducibilidad. La búsqueda de una estrategia de normalización para controlar las variaciones introducidas por la calidad de la muestra y las inconsistencias en el rendimiento de extracción, rendimiento de RT, eficiencia de amplificación, sigue siendo un desafío. El uso de genes de referencia o genes “housekeeping” ha permitido corregir las variaciones no biológicas, sin embargo, es

difícil establecer un solo gen de referencia universal para todos los tipos de tejidos que existen; este punto es crítico para asegurar resultados precisos y confiables (Drobna et al., 2018)

Aunque no existe un consenso de un control endógeno adecuado para el análisis de miRNAs circulantes, miR-16-5p ha sido reportado como uno de los controles endógenos más utilizados debido a su estabilidad y abundancia a lo largo de distintas muestras. Shahid *et al* en 2019 evaluaron 3 genes de referencia RNU6-2, mir-16-5p y cel-mir-39-1, como candidatos para la normalización de RT-qPCR en plasma de pacientes con LLA; por medio del algoritmo geNorm, demostraron que miR-16-5p circulante es el normalizador más estable y confiable para ensayos de perfiles de expresión de miRNAs en LLA ($M=0.418$). Además, encontraron que la media de los Ct de miR-16-5p (25.13 ± 0.1193) no muestra una diferencia significativa en pacientes con LLA con respecto al grupo control. Resultados similares fueron obtenidos en el presente trabajo de investigación, donde miR-16-5p fue seleccionado como control endógeno para la normalización de la expresión de miR-1290 y miR-26b en plasma de pacientes con LLA, mostrando estabilidad a lo largo de las muestras, además, la media de los valores de Ct no mostró una diferencia significativa entre el grupo de pacientes con LLA (27.21 ± 3.1) con respecto al grupo control (28.8 ± 2.3), siendo un buen normalizador, sin embargo, no parece mostrar gran abundancia en las muestras de plasma de los sujetos de estudio, por lo que resultaría interesante llevar a cabo la evaluación de otros genes normalizadores reportados en la bibliografía como let-7, RNU6, cel-miR-39, con el fin de obtener resultados más confiables.

En la actualidad, existen cerca de 1,000 miRNAs que han sido identificados en células humanas, regulando aproximadamente el 60% de los genes que codifican para proteínas en el genoma humano. Perfiles de expresión alterados de miRNAs pueden a su vez, conducir a una alteración en la expresión de sus genes blanco. (Navarrete-Meneses & Pérez-Vera, 2017)

La mayoría de los perfiles de miRNAs han sido realizados a partir de tejido o células tumorales, no obstante, resulta importante la generación de perfiles de expresión de

miRNAs circulantes (Cortez & Calin, 2009) Chen et al. demostraron que el suero y plasma contiene un gran número de miRNAs, los cuales parecen ser estables al calor, bajo o alto pH, almacenamiento extendido, así como ciclos de congelación-descongelación, condiciones que normalmente promueven la degradación del ARN. (Chen et al., 2008) Esto indica que los miRNAs que se obtuvieron de las muestras de plasma congelado, en el presente trabajo, existen en una forma resistente a la RNasa plasmática, además que el RNA obtenido mostró buena concentración y pureza. La estabilidad de los miRNAs circulantes en fluidos biológicos como suero o plasma es uno de los principales factores que contribuye a su uso como nuevos biomarcadores no invasivos para el diagnóstico y pronóstico de varios tumores (Mitchell et al., 2008)

Algunos miRNAs parecen ser exclusivos de tejido, mientras que otros muestran mayor nivel de expresión en suero o plasma. Por lo tanto, nuestro objetivo fue evaluar los miRNAs circulantes en plasma miR-1290 y miR-26b en pacientes con LLA como un posible mecanismo de regulación epigenético que contribuya a la generación y progresión de LLA, además, de ser posibles reguladores de la expresión de NAT1.

El miR-1290 es sobreexpresado en distintos tipos de cáncer, desempeña un papel de promotor tumoral, siendo un potencial biomarcador en cáncer de pulmón de células no pequeñas, relacionado con metástasis y pobre pronóstico (Mo et al., 2015). Por otra parte, Xiao et al., demostraron que miR-1290 promueve proliferación celular e invasión a través de la modulación de SOCS4 mientras que suprime la apoptosis celular *in vitro* en adenocarcinoma pulmonar. (Xiao et al., 2018). En carcinoma oral de células escamosas, la sobreexpresión de miR-1290 también promueve la migración celular, invasión y la transición epitelial-mesenquimal (Qin et al., 2019). Sin embargo, los niveles de expresión de miR-1290 en LLA aún no han sido ampliamente caracterizados.

En el presente trabajo, se encontró una tendencia a una mayor expresión de miR-1290 en pacientes con LLA comparado con el grupo control; es necesario aumentar el número de muestras analizadas para validar este dato. Esta información coincide con

el estudio realizado por Zhou *et al.* en 2017, donde encontraron que miR-1290 esta sobreexpresado en la línea celular SUP-B15 de LLA-B y en pacientes con diagnóstico de LLA-B, lo que sugiere la posibilidad de ser un blanco terapéutico. Por otra parte, nuestros resultados contrastan también con el estudio de Avigad *et al.* en 2016, donde a partir de células de aspirados de médula ósea, realizaron microarreglos y se encontraron que algunos miRNAs se encuentran desregulados en LLA, los cuales a su vez estaban relacionados con características clínicas de los pacientes como edad, subtipo celular, conteo de glóbulos blancos, riesgo y recaída, de los cuales 5 miRNAs fueron confirmados por medio de RT-qPCR, dentro de los que se encontraba miR-1290, el cual mostró una sobreexpresión; a su vez, los pacientes que expresaron altos niveles de miR-1290 tuvieron niveles más bajos de supervivencia libre de recaída comparado con aquellos pacientes que mostraron niveles bajos de dicho miRNA, por lo que miR-1290 puede ser utilizado como biomarcador pronóstico en LLA.

Hasta la fecha, no hay estudios que evalúen la asociación entre los niveles de expresión de miR-1290 con la expresión de NAT1 en LLA. En cuanto a los niveles de expresión de NAT1 en pacientes con LLA, Hernández-González *et al.* demostraron una disminución significativa en el valor absoluto de NAT1 en pacientes con LLA ($\bar{x}=564.4\pm312.1$ cel/ μ L) comparado con un grupo control ($\bar{x}=1324\pm660.8$ cel/ μ L) ($p=0.0004$), aunque dichos valores no parecen mostrar una correlación lineal con los niveles de expresión de miR-1290 obtenidos en nuestro estudio. No se descarta la posibilidad de que dicho miRNA regula a NAT1 bajo otras condiciones experimentales. Estos resultados contrastan con el estudio realizado por Endo *et al.* en 2014, donde se reportó que NAT1 es blanco directo de regulación por miR-1290, demostrando por medio de un ensayo de luciferasa, que miR-1290 disminuye directamente en forma significativa la expresión de NAT1 en pacientes con cáncer de mama. En nuestro estudio, los pacientes con LLA muestran niveles de expresión de miR-1290 con una tendencia al incremento o sobreexpresión, mientras que los valores de expresión de NAT1 se encuentran significativamente disminuidos en los mismos pacientes, lo que

coincide a su vez con una regulación negativa en la expresión de dicho gen por la sobreexpresión de este miRNA.

Por otro lado, miR-26b está involucrado en desarrollo embrionario temprano, regulación de la proliferación y otros procesos biológicos celulares; su sobreexpresión parece tener funciones de supresión tumoral. En cáncer colorectal, miR-26b disminuye la proliferación y la migración por la inhibición de la expresión de LEF1 y FUT4 (Zhang et al., 2014); la sobreexpresión de miR-26b induce apoptosis en células de cáncer de mama MCF-7 por medio de la unión a SLC7A11, y parece actuar como supresor tumoral por medio de la regulación de CDK8. (Li et al., 2014); la sobreexpresión de miR-26b inhibe la transición epitelio mesénquima por medio de USP9X, e inhibe la migración y la invasividad de líneas celulares HepG2 y Hep3B. (Shen et al., 2014)

Nuestros resultados no muestran una diferencia en la expresión de miR-26b en pacientes con LLA con respecto al grupo control, por lo que parece que la expresión relativa de dicho miRNA no se ve modificado en esta patología. Nuestros resultados son similares a los mostrados por Hernández-Bernal *et al* en 2015, donde no se encontró una disminución significativa de la expresión de miR-26b en linfocitos de pacientes con LLA-B, por lo que se sugiere que dicho miRNA no desempeña un papel en mecanismos involucrados con el inicio y progresión de LLA.

En años recientes, el avance en tecnologías, así como en el número creciente de estudios en LLA, han permitido que la supervivencia en pacientes haya sido notablemente incrementada. Las tasas de remisión completa han incrementado a más del 95% y la supervivencia libre de enfermedad de 5 años se ha alcanzado en un 63-83% (Avigad et al., 2016). Sin embargo, un gran reto continúa siendo que muchos pacientes presentan resistencia a la terapia, así como riesgo de recaída, por lo que es indispensable un mejor entendimiento de los mecanismos que conducen al inicio y progresión de LLA y que a su vez permitan el desarrollo de nuevas estrategias para mejorar la eficiencia de la terapia actual. Existen factores predictivos de riesgo que incluyen indicadores clínicos y de laboratorio en el diagnóstico, además, el tipo de leucemia es también determinante en la respuesta inicial al tratamiento. Dentro de los

factores pronósticos se encuentran la edad, los pacientes menores de un año y mayores de 10 años son considerados pacientes de alto riesgo, por lo que en estos grupos de edad es de consideración un tratamiento más agresivo con el fin de obtener resultados más favorables, los pacientes pediátricos en el grupo de edad entre 1 y 9 años tienen un mejor pronóstico. El sexo es también un factor de consideración, las mujeres presentan un mejor pronóstico que los hombres, esto se debe en parte a la aparición o riesgo de recaídas testiculares debido a factores que aún no han sido descritos con claridad, además se sabe que la LLA se presenta con mayor frecuencia en el sexo masculino. Otro factor importante es la raza, pacientes con descendencia afro o hispana tienen menor tasa de curación; pacientes con altos recuentos de leucocitos ($>50,000\text{cel}/\mu\text{L}$) tienen un pronóstico desfavorable y finalmente la presencia de ciertas translocaciones cromosómicas puede ser considerado como factores de riesgo o mal pronóstico en pacientes con LLA. La presencia de cualquiera de estas características mencionadas, conduce al médico a la estratificación de los pacientes en base al riesgo, ya sea riesgo habitual o alto riesgo. (Layton-Tovar, 2015)

Del total de 17 pacientes con LLA incluidos en nuestro estudio, 16 fueron estratificados en el grupo de alto riesgo y solo 1 fue estratificado en riesgo habitual; nuestros resultados demostraron una mayor prevalencia de LLA en hombres que en mujeres, 10 hombres y 7 mujeres pertenecían al grupo de pacientes con LLA, del cual 6 pacientes mostraron recaída, 50% eran hombres y 50% mujeres, sin embargo, se encontró que las mujeres con LLA tienden a sobreexpresar el miR-1290, no obstante, el ser mujer no se asocia en forma significativa con una mayor probabilidad de sobreexpresar dicho miRNA, y a su vez, la sobreexpresión de miR-1290 no se asocia significativamente con el riesgo de recaída. Por otra parte, del total de 6 defunciones que se presentaron, todas fueron en pacientes de género masculino, lo que coincide Layton-Tovar, donde se ha encontrado que los hombres suelen tener un pronóstico más desfavorable que las mujeres, así como un mayor riesgo de recaída, principalmente por el riesgo de recaída testicular, aunque en nuestro grupo de estudio, ningún paciente presentó este tipo de recaída.

En base al incremento en la expresión de miR-1290 en pacientes con LLA del sexo femenino, así como su tendencia al incremento en pacientes que mostraron recaída y por su posible implicación en la regulación directa de la expresión de NAT1, miR-1290 puede ser propuesto como un posible biomarcador pronóstico o como blanco terapéutico en LLA. Una limitante de la significancia de este estudio, es el tamaño pequeño de muestras analizadas, por lo que incrementar la n, podría dar más significancia a nuestros resultados.

Aunque diversos estudios han encontrado que la expresión alterada de NAT1, modificada por cambios genéticos como los SNPs, o bien, por mecanismos de regulación epigenética, como son los miRNAs, el mecanismo exacto por el cual la expresión de NAT1 modifica el riesgo de cáncer y progresión, aún no ha sido bien descrito, por lo que resultaría interesante evaluar en estudios futuros los mecanismos a nivel celular por los cuales la expresión y actividad de NAT1 puede conducir a crecimiento celular, proliferación y metástasis en LLA.

La hematopoyesis es un proceso por el cual las células madre hematopoyéticas pluripotenciales se renuevan y diferencian constantemente en células de diferentes linajes. La linfopoyesis es parte del proceso de hematopoyesis por el cual las células madre hematopoyéticas se diferencian en progenitores linfoides y finalmente en linfocitos B o T. El desarrollo de linfocitos T ocurre en el timo y el de linfocitos B en médula ósea. Las vías de señalización molecular que interactúan en el proceso de hematopoyesis son múltiples y la desregulación en uno o más puntos puede ser determinante en el desarrollo de LLA. De la misma manera, el efecto que ejercen las translocaciones puede desencadenar la expresión aberrante de las enzimas que regulan el proceso de señalización intracelular, las cuales a su vez son reguladas por distintos miRNAs. (Lazare et al., 2014). Sin embargo, aún no está definido cuales miRNAs tienen propiedades oncogénicas o supresoras de tumor que definan el contexto de transformación de las células B o T malignas. La Biometría hemática es el primer examen que hace sospechar un diagnóstico presuntivo de LLA al existir variaciones en sus parámetros, siendo de suma importancia y de gran ayuda al permitir

conocer el progreso en el proceso del tratamiento. Salguero-Barriga *et al.* en 2016 comprobó que los parámetros alterados en la biometría hemática son: disminución de los valores del hematocrito, hemoglobina, leucocitos y plaquetas antes del tratamiento quimioterapéutico, y que dichos valores regresan a los rangos aceptables al finalizar el tratamiento quimioterapéutico debido al éxito actual del tratamiento en pacientes con LLA y la alta tasa de remisión. Dichos resultados contrastan con lo encontrado en el presente trabajo, donde los pacientes con LLA muestran una disminución significativa en los valores de leucocitos, linfocitos, eritrocitos y hemoglobina con respecto al grupo control, corroborando que estos son los datos analíticos que se alteran con más frecuencia en pacientes pediátricos con LLA. Siendo los miRNAs reguladores centrales de la hematopoyesis y existiendo información de una relación entre la desregulación de los mismos y la generación y progresión de LLA, se planteó el objetivo de analizar la asociación entre los niveles de expresión de miR-1290 y miR-26b con los parámetros alterados de la biometría hemática en pacientes con LLA, sin embargo, los resultados no mostraron una asociación significativa lo que puede indicar que dichos miRNAs no están directamente involucrados en la regulación del proceso de hematopoyesis alterado en pacientes con LLA. Sin embargo, la correlación lineal negativa encontrada en los niveles de linfocitos y expresión de miR-1290 en sujetos control indica que al incrementar la expresión de miR-1290 en sujetos sanos, el número de linfocitos tiende a disminuir, por lo que se sugiere que dicho miRNA puede estar implicado en vías de regulación de la linfopoyesis normal que aún no han sido descritas.

La principal limitante del presente estudio, fue la cantidad pequeña de muestras analizadas, lo que condicionó en parte la significancia de nuestros resultados, por lo que en una perspectiva futura se espera incrementar el número de participantes, a pesar de esto, nuestro estudio brinda las bases para el análisis de miR-1290 en pacientes con LLA y su posible implicación en el proceso de generación y desarrollo de dicha enfermedad, además que puede ser evaluado en estudios futuros como un posible biomarcador en el pronóstico de LLA y como posible blanco terapéutico debido

a su mayor expresión encontrada en pacientes del sexo femenino así como en pacientes con recaída, resaltando su implicación como mecanismo de regulación epigenética sobre NAT1.

9. CONCLUSIONES

El presente estudio provee evidencia de que la expresión relativa de miR-1290 muestra una tendencia al incremento en pacientes con LLA, principalmente en pacientes del grupo de mujeres y pacientes que mostraron recaída, sin embargo, más estudios son necesarios para proponer el rol de miR-1290 como posible biomarcador pronóstico o blanco terapéutico en LLA. Por otra parte, miR-26b no muestra diferencias en su expresión en pacientes con LLA con respecto al grupo control y al mismo tiempo se demostró que miR-16-5p puede ser utilizado como un control endógeno normalizador en LLA.

No se encontró una correlación lineal significativa entre la expresión aumentada de miR-1290 y la expresión disminuida de NAT1 en pacientes con LLA, sin embargo, está demostrado que NAT1 es blanco de regulación directa de miR-1290. Más estudios deben ser realizados para investigar la asociación entre la expresión de miR-1290 y NAT1 y su posible implicación en la generación y progresión de LLA pediátrica, además resulta necesario incrementar el número de muestras analizadas para obtener resultados con mayor significancia.

Finalmente, miR-1290 y miR-26b no mostraron asociación con las variables hematológicas de glóbulos blancos, linfocitos, eritrocitos y hemoglobina, sugiriendo que dichos miRNAs no juegan un papel directo en la regulación de la hematopoyesis.

10. PERSPECTIVAS

1. Llevar a cabo la evaluación de la expresión relativa de miR-1290 y miR-26b en un mayor número de muestras de plasma para incrementar la significancia estadística
2. Evaluar el uso de otros controles endógenos ya sea en forma individual o bien, una combinación de varios genes, que muestren mayor abundancia y estabilidad que miR-16-5p a lo largo de las muestras.
3. Evaluar la expresión relativa del resto de los miRNAs que habían sido propuestos como posible mecanismo de regulación epigenético de NAT1 por medio de herramientas bioinformáticas (miR-126-5p, miR-4795)
4. Completar la base de datos con la información de las biometrías hemáticas de las muestras de plasma de pacientes con LLA que fueron reclutados en el estudio "Evaluación del estado epigenético de las N-acetiltransferasas NAT1 y NAT2 en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda".
5. Evaluar los mecanismos celulares por los que NAT1 puede conducir al desarrollo y progresión de LLA.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Avigad, S., Verly, I. R., Lebel, A., Kordi, O., Shichrur, K., Ohali, A., Hameiri-Grossman, M., Kaspers, G. J., Cloos, J., Fronkova, E., Trka, J., Luria, D., & Kodman, Y. (2016). miR expression profiling at diagnosis predicts relapse in pediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 55(4), 328–339.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215–233.
- Bernadette, R. (2004). *Hematología. Fundamentos y aplicaciones clínicas*. Mc Graw Hill.
- Burke, M. J., Bhatla, T., Wayne, A., & Brown, P. (2014). Epigenetic modifications in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in Pediatric*, 2(42). <https://doi.org/10.3389/fped.2014.00042>
- Butcher, N., Arulpragasam, A., Goh, H. L., & Davey, T. (2005). Genomic organization of human arylamine N-acetyltransferase Type I reveals alternative promoters that generate different 5'-UTR splice variants with altered translational activities. *Biochemical Journal*, 387(1), 119–127.
- Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews. Cancer*, 6(11), 857–866.
- Chambers, A., Groom, A., & MacDonald, I. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews. Cancer*, 2(8), 565–572.
- Chatterton, Z., Morenos, L., Saffery, R., Craig, J., Ashley, D., & Wong, N. (2010). DNA methylation and miRNA expression profiling in childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Epigenomics*, 2(5), 697–708.
- Checa, C. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 20(3), 213–221.
- Chen, I., Ba, Y., & Chen-Yu, Z. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, 18, 997–1006.
- Chessells, J., Harrison, J., Richards, S., & Bailey, C. (2001). Down's syndrome and acute lymphoblastic leukaemia: clinical features and response to treatment. *Archives of Disease in Childhood*, 85, 321–325.

- Chow, Y., Alias, H., & Jamal, R. (2017). Meta analysis of gene expression in relapsed childhood B- acute lymphoblastic leukemia. *BMC Cancer*, 17(1), 120.
- Cortez, M., & Calin, G. (2009). MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opinion on Biological*, 9(6), 703–711. <https://doi.org/10.1517/14712590902932889>
- Dawson, M., & Kouzarides, T. (2012). Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*, 150(1), 12–27.
- Dixon-McIver, A., East, P., Mein, C. A., Cazier, J. B., Molloy, G., Chaplin, T., Lister, T. A., Young, B. D., & Debernardi, S. (2008). Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. *PLoS ONE*, 3(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002141>
- Drobna, M., Szarzyńska-Zawadzka, Bronisława Dąca-Roszak, P., Kosmalska, M., Jaksik, R., Witt, M., & Dawidowska, M. (2018). Identification of Endogenous Control miRNAs for RT-qPCR in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10).
- Endo, Y., Yamashita, H., Takahashi, S., Sato, S., Yoshimoto, N., Asano, T., Hato, Y., Dong, Y., Fujii, Y., & Toyama, T. (2014). Immunohistochemical determination of the miR-1290 target arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1) as a prognostic biomarker in breast cancer. *BMC Cancer*, 14(990). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-990>
- Etheridge, A., Lee, I., Hood, L., Galas, D., & Wang, K. (2011). Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. *Mutation Research*, 717(1–2), 85–90.
- Fajardo-Gutiérrez, A. (2017). Medición en epidemiología: prevalencia, incidencia, riesgo, medidas de impacto. *Revista Alergia México*, 64(1), 109–120.
- Feinberg, A. (2008). Epigenetics at the epicenter of modern medicine. *JAMA*, 299(11), 1345–1350.
- Gangaraju, V., & Lin, H. (2009). MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(2).
- Garzon, R., Volinia, S., Liu, C. G., Fernandez-Cymering, C., Palumbo, T., Pichiorri, F., Fabbri, M., Coombes, K., Alder, H., Nakamura, T., Flomenberg, N., Marcucci, G., Calin, G. A., Kornblau, S. M., Kantarjian, H., Bloomfield, C. D., Andreeff, M., & Croce, C. M. (2008). MicroRNA signatures associated with cytogenetics and

- prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*, 111(6), 3183–3189. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-098749>
- Ghodousi, E. S., & Rahgozar, S. (2018). MicroRNA-326 and microRNA-200c: Two novel biomarkers for diagnosis and prognosis of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(7), 6024–6032.
- Hein, D., W., Doll, M. A., Rustan, T. D., Gray, K., Feng, Y., Ferguson, R. J., & Grant, D. M. (1993). Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases. *Carcinogenesis*, 14(8), 1633–1638.
- Jaime Pérez, J. C. (2015). Célula madre hematopoyética y hematopoyesis. *Hematología, la sangre y sus componente*. 2da edición, pp. 1–3.
- Jordán, J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM*, 100–106.
- Juliusson, G., Oscier, D. G., Fitchett, M., Ross, F. M., Stockdill, G., Mackie, M. J., Parker, A. C., Castoldi, G. L., Cuneo, A., Knuutila, S., Elonen, E., & Gahrton, G. (1990). Prognostic Subgroups in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Defined by Specific Chromosomal Abnormalities. *New England Journal of Medicine*, 323(11), 720–724. <https://doi.org/10.1056/nejm199009133231105>
- Kato, R. (1986). Metabolic activation of mutagenic heterocyclic aromatic amines from protein pyrolysates. *Critical Reviews in Toxicology*, 16(4), 307–348.
- Krajinovic, M., Richer, C., Sinnett, H., Labuda, D., & Sinnett, D. (2000). Genetic polymorphisms of N-acetyltransferases 1 and 2 and gene-gene interaction in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 9(6), 557–562.
- Layton-Tovar, C. (2015). Factores de pronóstico en leucemia linfoblástica aguda pediátrica: posibles marcadores moleculares. *Médecina e Investigación*, 3(1), 85–91.
- Li, C., Feng, Y., Coukos, G., & Zhang, L. (2009). Therapeutic microRNA strategies in human cancer. *The AAPS Journal*, 11(4), 747–757.
- Li, J., Li, X., Kong, X., Luo, Q., Zhang, J., & Fang, L. (2014). miRNA-26b inhibits cellular proliferation by targeting CDK8 in breast cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7(3), 558–565.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B., Mak, R., & Ferrando, A. (2005). MicroRNA expression profiles

- classify human cancers. *Nature*, 435(7043), 834–838. <https://doi.org/10.1038/NATURE03702>
- Luan, C., Yang, Z., & Chen, B. (2015). The functional role of microRNA in acute lymphoblastic leukemia: Relevance for diagnosis, differential diagnosis, prognosis, and therapy. *OncoTargets and Therapy*, 8, 2903–2914. <https://doi.org/10.2147/OTT.S92470>
- McManus, M. T. (2003). MicroRNAs and cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 13(4), 253–258.
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K. C., Allen, A., Lin, D. W., Urban, N., Drescher, C. W., Knudsen, B. S., Stirewalt, D. L., Gentleman, R., Vessella, R. L., Nelson, P. S., Martin, D. B., & Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(30), 10513–10518.
- Mo, D., Gu, B., Gong, X., Wu, L., Wang, H., Jiang, Y., Zhang, B., Zhang, M., Zhang, Y., Xu, J., & Pan, S. (2015). miR-1290 is a potential prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 7(9), 1570–1579. <https://doi.org/10.3978/J.ISSN.2072-1439.2015.09.38>
- Mullighan, C. (2012). The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 389–396.
- Navarrete-Meneses, M. del P., & Pérez-Vera, P. (2017). Alteraciones epigenéticas en leucemia linfoblástica aguda. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 74(4), 243–264. <https://doi.org/10.1016/J.BMHIMX.2017.02.005>
- Pérez-Saldivar, M., Fajardo-Gutiérrez, A., Bernáldez-Ríos, R., Martínez-Avalos, A., Medina-Sanson, A., Espinosa-Hernández, L., de Diego Flores-Chapa, J., Amador-Sánchez, R., Gabriel Peñaloza-González, J., Javier Álvarez-Rodríguez, F., Bolea-Murga, V., Flores-Lujano, J., del Carmen Rodríguez-Zepeda, M., Rivera-Luna, R., María Dorantes-Acosta, E., Jiménez-Hernández, E., Alvarado-Ibarra, M., Margarita Velázquez-Aviña, M., Refugio Torres-Nava, J., ... Manuel Mejia-Arangure, J. (2011). Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer*, 17(355). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-355>
- Qin, W. J., Wang, W. P., Wang, X. B., Zhang, X. T., & Du, J. D. (2019). MiR-1290 targets CCNG2 to promote the metastasis of oral squamous cell carcinoma.

European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 23(23), 10332–10342.

- Quiñones, L., Lee, K., Varela, N., Escala, M., García, K., Godoy, L., Castro, A., Soto, J., Saavedra, I., & Cáceres, D. (2006). Farmacogenética del cáncer: Estudio de variaciones genéticamente determinadas en la susceptibilidad a cáncer por exposición a xenobióticos Cancer pharmacogenetics: Study of genetically determined variations on cancer susceptibility due to xenobiotic expos. In *Rev Méd Chile*. 134.
- Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., & Wasserman, S. A. (2011). *Translation is the RNA-directed synthesis of a polypeptide: A closer look*. Person.
- Rivera-Luna, R., Correa-Gonzalez, C., Altamirano-Alvarez, E., Anchez-Zubieta, F. S., Ardenas-Card Os, R. C., Escamilla-Asian, G., Olaya-Vargas, A., Bautista-Marquez, A., & Aguilar-Romo, M. (2013). Incidence of childhood cancer among Mexican children registered under a public medical insurance program. *International Jorunal of Cancer*, 1646–1650. <https://doi.org/10.1002/ijc.27771>
- Salguero-Barriga, A. B. (2016). Comparación de los parámetros de la biometría hemática al inicio y final del tratamiento quimioterapéutico en una población de 2 a 16 años con leucemia linfoblástica aguda que acudieron a cruz vital en el periodo 2012-2016.
- San Jose-Eneriz, E., Agirre, X., Rodríguez-Otero, P., & Prosper, F. (2013). Epigenetic regulation of cell signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia. *Epigenomics*, 5(5), 525–538. <https://doi.org/10.2217/EPI.13.56>
- Schotte, D., de Menezes, R. X., Moqadam, F. A., Khankahdani, L. M., Lange-Turenhout, E., Chen, C., Pieters, R., & den Boer, M. L. (2011). MicroRNA characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 96(5), 703–711. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.026138>
- Shah, A., Leidinger, P., Blin, N., & Meese, E. (2010). miRNA: small molecules as potential novel biomarkers in cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 17(36), 4427–4432.
- Shahid, S., Shaheen, J., Shahid, W., Akhtar, M. W., & Sadaf, S. (2019). MiR-16-5p as a suitable reference gene for normalization of quantitative real time PCR in acute lymphoblastic leukemia. *Pakistan Journal of Zoology*, 51(2), 747–754. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2019.51.2.747.754>

- Shen, G., Lin, Y., Yang, X., Zhang, J., Xu, Z., & Jia, H. (2014). MicroRNA-26b inhibits epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma by targeting USP9X. *BMC Cancer*, 14(393). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-393>
- Slack, J. (2014). Genes: A Very Short Introduction. In *Oxford*.
- Solidoro-Santisteban, A. (2006). Cáncer en el Siglo XXI. *Acta Médica Peruana*, 23(2), 112–118.
- Swellam, M., Hashim, M., Mahmoud, M. S., Ramadan, A., & Hassan, N. M. (2018). Aberrant Expression of Some Circulating miRNAs in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biochemical Genetics*, 56(4), 283–294.
- Tiang, J. M., Butcher, N. J., Cullinane, C., Humbert, P. O., & Minchin, R. F. (2011). RNAi-Mediated Knock-Down of Arylamine N-acetyltransferase-1 Expression Induces E-cadherin Up-Regulation and Cell-Cell Contact Growth Inhibition. *PLoS ONE*, 6(2).
- Tiang, J. M., Butcher, N. J., & Minchin, R. F. (2015). Effects of human arylamine N-acetyltransferase I knockdown in triple-negative breast cancer cell lines. *Cancer Medicine*, 4(4), 565–574. <https://doi.org/10.1002/CAM4.415>
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), research0034.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Xiao, X., Yang, D., Gong, X., Mo, D., Pan, S., & Xu, J. (2018). miR-1290 promotes lung adenocarcinoma cell proliferation and invasion by targeting SOCS4. *Oncotarget*, 9(15), 977–988.
- Zenser, T. V., Lakshmi, V. M., Rustan, T. D., Doll, M. A., Deitz, A. C., Davis, B. B., & Hein, D. W. (n.d.). Human N-acetylation of benzidine: role of NAT1 and NAT2. *Cancer Research*, 56(17), 3941–3947.
- Zhang, J., Walsh, M. F., Wu, G., Edmonson, M. N., Gruber, T. A., Easton, J., Hedges, D., Ma, X., Zhou, X., Yergeau, D. A., Wilkinson, M. R., Vadodaria, B., Chen, X., McGee, R. B., Hines-Dowell, S., Nuccio, R., Quinn, E., Shurtleff, S. A., Rusch, M., ... Downing, J. R. (2015). Germline Mutations in Predisposition Genes in Pediatric Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 373(24), 2336–2346. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1508054>
- Zhang, Z., Kim, K., Li, X., Moreno, M., Sharp, T., Goodheart, M. J., Safe, S., Dupuy, A. J., & Amendt, B. A. (2014). MicroRNA-26b represses colon cancer cell proliferation

by inhibiting lymphoid enhancer factor 1 expression. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(7), 1942–1951.

12. ANEXOS

Anexo 1.- Categorización de variables

Variable	Tipo	Clasificación	Posibles resultados	Unidades
VARIABLES DEMOGRÁFICAS				
Edad	Independiente	Cuantitativa discreta	Valores numéricos 0-17 años	Años
Sexo	Independiente	Cualitativa	Masculino o Femenino	---
VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS				
Peso	Independiente	Cuantitativa continua	Valores numéricos continuos	Kg
Estatura	Independiente	Cuantitativa continua	Valores numéricos continuos	m
IMC	Independiente	Cuantitativa continua	Valores numéricos continuos	Kg/m ²
VARIABLES HEMATOLÓGICAS				
Eritrocitos	Dependiente	Cuantitativa continua	Numero de eritrocitos totales en sangre	cel/μL
Hemoglobina	Dependiente	Cuantitativa continua	Concentración de Hb en sangre	mg/dL
Hematocrito	Dependiente	Cuantitativa continua	Volumen ocupados por eritrocitos en sangre	%

Leucocitos	Dependiente	Cuantitativa continua	Numero de leucocitos en sangre	cel/ μ L
Plaquetas	Dependiente	Cuantitativa continua	Numero de plaquetas en sangre	cel/ μ L
miRNAS				
Expresión relativa de miRNA	Independiente	Cuantitativa continua	Valores numéricos continuos	-----

13. GLOSARIO

Apoptosis: Mecanismo fisiológico de muerte celular programada (Jordán, 2003)

Cáncer: Proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células anormales. Puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. (Solidoro-Santisteban, 2006)

Enzima: Molécula orgánica que actúan como catalizador de reacciones químicas, tiene la capacidad de acelerar la velocidad de reacción. (Smith et al. 1997)

Epigenética: Rama de la ciencia que estudia los cambios heredables en la expresión génica, los cuales ocurren sin una alteración en la secuencia de ADN. (Feinberg, 2008)

Evaluación: Atribuir un valor a algo o a alguien, en función de un proyecto implícito o explícito.

Gen: Unidad física básica de la herencia. Almacena la información genética y permite transmitirla a la descendencia. (Slack, 2014)

Incidencia: Tasa de medida epidemiológica que permite determinar los casos nuevos que se presentan en una población específica en un tiempo determinado (Fajardo, 2017).

Leucemia linfoblástica aguda: Proliferación incontrolada de células inmaduras malignas denominadas linfoblastos que se originan en médula ósea. (Chow et al., 2017)

Leucocito: Células encargadas de defender al organismo frente a infecciones y de ayudar a eliminar los residuos y desechos de los tejidos. Se producen y almacenan en médula ósea. (Bernadette, 2004)

Linfoblasto: Célula inmadura que puede desarrollarse y llegar a ser un linfocito. (Bernadette, 2004)

Hematopoyesis: Proceso a través del cual se generan las células sanguíneas, a través de la cual intervienen una gran variedad de tipos celulares y es regulado por diversos factores. (Jaime Pérez, 2015)

Metástasis: Proceso de propagación de un foco canceroso a un órgano distinto de aquel en que se inició a través de la sangre o la linfa. (Chambers et al., 2002)

MicroRNA: Pequeñas moléculas de ARN (21-23 nucleótidos), no codificantes para proteínas que constituyen una extensa familia de genes reguladores postranscripcionales. Están implicados en la regulación de varios procesos biológicos, como la diferenciación celular, la proliferación, la apoptosis y en el desarrollo embrionario y tisular. (Bartel, 2009)

NAT-1: Enzima encargada de metabolizar fármacos y xenobioticos por medio de acetilación, principalmente arilaminas y aminos aromáticas. (Butcher et al., 2005)

Traducción: Proceso en el que el ARNm se decodifica para construir una proteína (Reece et al., 2011)

Transcripción: Proceso de conversión de ADN a ARN (Reece et al., 2011)

Polimorfismo genético: Lugar en la secuencia de ADN donde existe una variación, y la variante menos común está presente en al menos el 1% por ciento de la población analizada.(Checa, 2007)

Polimorfismo genético de un solo nucleótido: tipo de polimorfismo que producen una variación en un solo par de bases. (Checa, 2007)

Prevalencia: Es la proporción de personas que se encuentran enfermas al momento de evaluar el padecimiento en una población específica (Fajardo-Gutiérrez, 2017)

Xenobiótico: Sustancia química que se encuentra dentro de un organismo que no se produce naturalmente o se espera que no esté presente dentro del mismo (Quiñones et al., 2006)