



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

MICRORNAS CIRCULANTES EN
SALIVA Y ORINA COMO
POTENCIALES BIOMARCADORES DE
ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA
PEDIÁTRICA

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

ALEJANDRA PANDO CACIANO

LIMA – PERÚ

2024

ASESORA:

Dra. Mónica Pajuelo Travezaño

CO-ASESOR:

Dr. Holger Maita Malpartida

JURADO DE TESIS

DR. PABLO TSUKAYAMA CISNEROS ALBINO

PRESIDENTE

DRA. VANESSA KARINA ADAUI SICHERI

VOCAL

DRA. CLAUDIA INES GLORIA MACHICADO RIVERO

SECRETARIO (A)

DEDICATORIA

A mis padres y hermana.

A mi mamita Emma.

A todas las personas que con su amor, paciencia y empuje hicieron posible
realizar esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y mi hermana, por su soporte incondicional en el recorrido de este largo camino. Sin su amor y compañía, nada sería posible.

A mi mamita Emma, por saber guiarme con su amor a pesar de no estar físicamente.

A mi amiga, hermana de otra mamá, Pauline Mamaní, por su paciencia, compañía y amistad incondicional.

A mi amiga, Arianna Basto, por su amistad incondicional a pesar de la distancia.

Al Dr. Holger Maita, por su amistad, cariño y enseñanzas a lo largo de todos estos años de estudio y trabajo.

A la Dra. Mónica Pajuelo, por sus enseñanzas y comprensión durante el desarrollo de la tesis.

A la Sra. Maritza Núñez y al Dr. Robert Gilman, por su invaluable donación para el desarrollo de la tesis.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

El presente trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), a través de su unidad ejecutora “Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica” (FONDECYT), contrato N° 165-2020-FONDECYT.

DECLARACIÓN DE AUTOR			
FECHA	13	JULIO	2024
APELLIDOS Y NOMBRES DEL EGRESADO	PANDO CACIANO ALEJANDRA		
PROGRAMA DE POSGRADO	DOCTORADO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR		
AÑO DE INICIO DE LOS ESTUDIOS	2021		
TÍTULO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE GRADO	MICRORNAS CIRCULANTES EN SALIVA Y ORINA COMO POTENCIALES BIOMARCADORES DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA PEDIÁTRICA		
MODALIDAD DE TRABAJO DE GRADO	TESIS		
Declaración del Autor			
El presente Trabajo de Grado es original y no es el resultado de un trabajo en colaboración con otros, excepto cuando así está citado explícitamente en el texto. No ha sido ni enviado ni sometido a evaluación para la obtención de otro grado o diploma que no sea el presente.			
Teléfono de contacto (fijo / móvil)	955364055		
E-mail	alejandra.pando@upch.pe		



Firma del egresado

DNI:70417451

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	5
ABSTRACT	7
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
1.2. JUSTIFICACIÓN	8
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. GENERAL.....	12
2.2. ESPECÍFICOS.....	12
3. MARCO TEÓRICO.....	13
3.1. INCIDENCIA Y MORTALIDAD DE LA LLA	13
3.2. TRATAMIENTO DE LA LLA	14
3.3. MONITOREO DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO MEDIANTE LA MEDICIÓN DE LA EMR.....	15
3.4. BASES GENÉTICAS DE LA LLA.....	18
3.5. BIOGÉNESIS DE LOS MICRORNAS Y ROL EN EL PROCESO DE HEMATOPOYESIS.....	21
3.6. MICRORNAS CIRCULANTES: GENERALIDADES	24
4. METODOLOGÍA	26
4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO	26
4.2. DISEÑO DEL ESTUDIO	26
4.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN O EXCLUSIÓN.....	30
4.4. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL	30
4.8. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD Y PUREZA DEL RNA AISLADO	36
4.9. PERFILADO DE MICRORNAS MEDIANTE sRNA-SEQ Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	36
4.10. SELECCIÓN DE MICRORNAS DE REFERENCIA.....	38
4.11. SÍNTESIS DE cDNA Y qPCR	39
4.12. ANÁLISIS DE DATOS.....	40
4.13. ASPECTOS ÉTICOS.....	43
5. RESULTADOS	45
5.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	45

5.2. IDENTIFICACIÓN DE MICRORNAS EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE MEDIANTE sRNA-SEQ.....	50
5.2.1. ANÁLISIS DE sRNA-SEQ EN SALIVA	50
5.2.2. ANÁLISIS DE sRNA-SEQ EN ORINA	69
5.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CONTROL EXÓGENO (CEL-MIR-39) PARA LA EXTRACCIÓN DE RNA.....	83
5.4. DETERMINACIÓN DE MICRORNAS DE REFERENCIA PARA EL ANÁLISIS MEDIANTE RT-qPCR	85
5.5. VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN SALIVA MEDIANTE RT-qPCR.....	87
5.6. DETERMINACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LOS MICRORNAS CIRCULANTES EN SALIVA.....	88
5.6.1. MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MICRORNAS	88
5.6.2. ANÁLISIS DE CURVAS ROC	90
6. DISCUSIONES	92
7. CONCLUSIONES	106
8. RECOMENDACIONES	107
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
10. ANEXOS.....	121
ANEXO 1: ASENTIMIENTO INFORMADO PARA NIÑOS MENORES DE 12 AÑOS	121
ANEXO 2: ASENTIMIENTO INFORMADO PARA NIÑOS Y ADOLESCENTES ENTRE 12 Y 17 AÑOS	124
ANEXO 3: CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PADRES	133
ANEXO 4: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS	141
ANEXO 5: FÓRMULAS MATEMÁTICAS PARA EL CÁLCULO MANUAL DEL TAMAÑO DE MUESTRA.....	144
ANEXO 6: RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE PCA EN SALIVA	146
ANEXO 7: RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE PCA EN ORINA	151

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Frecuencia de los diferentes subtipos genético moleculares y citogenéticos en LLA pediátrica.	19
Figura 2. Flujo general de trabajo	27
Figura 3 Flujo de pasos del análisis bioinformático de la data proveniente del sRNA-Seq37	
Figura 4. Flujo para la selección de los pacientes incluidos en el estudio	46
Figura 5. Distribución del conteo de lecturas no normalizadas en saliva	52
Figura 6. Densidad del conteo de lecturas no normalizadas en saliva	53
Figura 7. Distribución del conteo de lecturas normalizadas en saliva	55
Figura 8. Densidad del conteo de lecturas normalizadas en saliva	56
Figura 9. PCA según grupo de riesgo de recaída, en saliva	57
Figura 10. PCA según lote de secuenciación, en saliva	57
Figura 11. Mapa de calor basado en la correlación entre muestras de saliva	59
Figura 12. Volcano plot con los resultados del DEA en saliva.....	61
Figura 13. Mapa de calor para los 30 microRNAs expresados diferencialmente en saliva	65
Figura 14. Conteos de lectura de los 3 microRNAs con los mayores grados de sobreexpresión en saliva.....	67
Figura 15. Conteos de lectura de los 3 microRNAs con los mayores grados de subexpresión en saliva.....	68
Figura 16. Distribución del conteo de lecturas no normalizadas en orina	71
Figura 17. Densidad del conteo de lecturas no normalizadas en orina	72
Figura 18. Distribución del conteo de lecturas normalizadas en orina	74
Figura 19. Densidad del conteo de lecturas normalizadas en orina	75
Figura 20. PCA según grupo de riesgo, en orina	76
Figura 21. PCA según lote de secuenciación, en orina	77
Figura 22. Mapa de calor basado en la correlación entre muestras de orina.....	78
Figura 23. Volcano plot con los resultados del DEA en orina.....	79
Figura 24. Mapa de calor para los 2 microRNAs expresados diferencialmente en orina...	81
Figura 25. Gráfico de puntos para los conteos de lectura de los 2 microRNAs expresados diferencialmente en orina	83
Figura 26. Valores de Cq para el ensayo realizado con concentraciones de cel-miR-39 de 5.71, 57.14 y 571.43 pmol/l en muestras de saliva	84
Figura 27. Valores de Cq para el ensayo realizado con concentraciones de cel-miR-39 de 57.14 y 571.43 pmol/l en muestras de saliva	85
Figura 28 Resultados del análisis de geNorm de los microRNAs analizados	86
Figura 29 ΔCq para el miR-1290, miR-1246 y miR-223-3p, en cada grupo de riesgo.....	89
Figura 30 Valores de AUC para el miR-1290, miR-223-3p, miR-1246 y la combinación de los 3 microRNAs.....	90
Figura 31. PCA según edad, en saliva.....	146
Figura 32. PCA según sexo, en saliva	147
Figura 33. PCA según perfil citogenético, en saliva	148
Figura 34. PCA según perfil molecular, en saliva.....	149
Figura 35. PCA según respuesta a prednisona, en saliva	150
Figura 36. PCA según edad, en orina.....	151
Figura 37. PCA según sexo, en orina	152
Figura 38. PCA según perfil citogenético, en orina	153
Figura 39. PCA según perfil molecular, en orina.....	153
Figura 40. PCA según respuesta a la prednisona, en orina	154

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Prevalencia y pronóstico de subtipos genéticos de la LLA-B.....	20
Tabla 2. Definición de las categorías para el resultado de medición de la EMR.....	29
Tabla 3. Tamaños de muestra estimados para la fase exploratoria	32
Tabla 4. Tamaños de muestra estimados para la fase de validación clínica	33
Tabla 5. Características sociodemográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio	48
Tabla 6. Mediana y valor máximo del conteo de lecturas crudas para las muestras de saliva	51
Tabla 7. Mediana y valor máximo del conteo de lecturas normalizadas para las muestras de saliva.....	54
Tabla 8. Promedio de lecturas, \log_2 FC y valor de p para los 30 microRNAs expresados diferencialmente en saliva	62
Tabla 9. Mediana y valor máximo del conteo de lecturas crudas para las muestras de orina	70
Tabla 10. Mediana y valor máximo del conteo de lecturas normalizadas para las muestras de orina.....	73
Tabla 11. Promedio de lecturas, \log_2 FC y valor de p para los 2 microRNAs expresados diferencialmente en orina	80
Tabla 12 Valores-M para los microRNAs analizados.....	87
Tabla 13. Promedio del ΔCq , FC y valor de p para el miR-1290, miR-223-3p y miR-1246 (fase de validación técnica)	88
Tabla 14. Promedio del ΔCq , FC y valor de p para el miR-1290, miR-1246 y miR-223-3p (fase de validación clínica).....	89
Tabla 15 Punto de corte óptimo, sensibilidad y especificidad para el miR-1290, miR-223-3p y miR-1246.....	91

RESUMEN

A pesar del incremento significativo de la sobrevida, alrededor del 20% de los niños con leucemia linfoblástica aguda (LLA) sufren de recaída luego del tratamiento. La determinación de la enfermedad mínima residual (EMR), en la médula ósea, es un poderoso predictor de recaída. Los microRNAs son secretados por las células tumorales en fluidos como la orina y la saliva, en niveles que reflejan el estado fisiológico de un individuo, y pueden servir como biomarcadores no invasivos de EMR. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la utilidad de los microRNAs circulantes en saliva y orina como biomarcadores de EMR. Se recolectaron muestras de saliva y orina el día 15 de quimioterapia de pacientes menores de 18 años diagnosticados con LLA. Los pacientes se clasificaron en el grupo de riesgo alto (GRA) o el grupo de riesgo estándar-intermedio (GRSI) de recaída, según la EMR del día 15. Inicialmente, se examinó el perfil de expresión de microRNAs en 6 pacientes de cada grupo mediante secuenciación de RNAs pequeños. La sobreexpresión de microRNAs se confirmó mediante RT-qPCR en 23 pacientes del GRA y 26 del GRSI. El secuenciación reveló 30 microRNAs expresados diferencialmente en saliva y 2 en orina. Entre estos, miR-1246, miR-223-3p y miR-1290 mostraron los niveles más altos de sobreexpresión en saliva ($\text{Log}_2 \text{FC} = 4.00, 3.95 \text{ y } 3.73$, respectivamente). Los 2 microRNAs expresados diferencialmente en orina estuvieron subexpresados. Durante la validación, se confirmó la sobreexpresión del miR-223-3p en saliva ($\text{Log}_2 \text{FC} = 1.19, p = 0.025$). El uso individual de este microRNA y la combinación del miR-1246, miR-223-3p y miR-1290 permitió discriminar entre pacientes del grupo GRA y GRSI ($\text{AUC} = 0.71, \text{IC } 95\%: 0.55-0.86$, y $\text{AUC} = 0.72, \text{IC } 95\%: 0.57-0.87$, respectivamente). Los resultados sugieren que miR-223-3p, solo o en combinación con miR-223-3p y miR-1290, podría representar un potencial

biomarcador no invasivo de EMR en la LLA pediátrica; sin embargo, es necesaria una validación en una cohorte de pacientes más grande.

PALABRAS CLAVES: niños, leucemia linfoblástica aguda, microRNA, enfermedad mínima residual, biomarcador, no invasivo.

ABSTRACT

Despite significant advancements in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL), about 20% of pediatric patients experience a relapse. Minimal residual disease (MRD) measurement in the bone marrow is a strong predictor of relapse. Tumor cells release microRNAs into bodily fluids, such as urine and saliva, at levels that accurately reflect an individual's physiological state. Thus, microRNAs represent potential noninvasive MRD biomarkers. This study aimed to evaluate the use of circulating microRNAs in urine and saliva as noninvasive biomarkers of MRD. Saliva and urine samples were collected from pediatric ALL patients under 18 on day 15 of chemotherapy. Patients were categorized into high-risk (HRR) and standard-intermediate risk of relapse (SIRR) groups based on MRD on day 15. Small RNA sequencing was conducted to examine the microRNA expression profile in six patients from each risk group. Subsequently, the upregulation of microRNAs was confirmed using RT-qPCR in 23 patients from the HRR group and 26 patients from the SIRR group. The sequencing analysis identified 30 differentially expressed microRNAs in saliva and 2 in urine. Among these, miR-1246, miR-223-3p, and miR-1290 showed the highest levels of upregulation in saliva. Upon validation, the upregulation of miR-223-3p in saliva was confirmed ($\text{Log}_2 \text{FC} = 1.19$, $p = 0.025$). The use of miR-223-3p alone, as well as in combination with miR-1246 and miR-1290, was capable of distinguishing between HRR and SIRR patients ($\text{AUC} = 0.71$, 95% CI: 0.55-0.86, and $\text{AUC} = 0.72$, 95% CI: 0.57-0.87, respectively). These results suggest that miR-223-3p, alone and in combination with miR-223-3p and miR-1290, could potentially serve as noninvasive biomarkers of MRD in pediatric ALL; however, further validation in a larger patient cohort is necessary.

KEYWORDS: children, acute lymphoblastic leukemia, microRNA, minimal residual disease, biomarker, non-invasive

1. INTRODUCCIÓN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una enfermedad caracterizada por la proliferación incontrolada de linfocitos T o B inmaduros y sus progenitores (1). La LLA es el tipo de cáncer más frecuente en niños y adolescentes, con una incidencia anual de alrededor de 34 por cada millón de menores de 20 años reportada en los Estados Unidos durante el periodo 2001-2014 (2). A nivel de Perú, se ha reportado que la incidencia anual de LLA durante el periodo 2013-2015 fue de 78.44 por millón de menores de 14 años (3).

Los avances significativos en el tratamiento de la LLA han permitido alcanzar una supervivencia a 5 años superior al 90 % en la mayoría de los países desarrollados (4). Sin embargo, a pesar de los avances significativos en el tratamiento de la enfermedad, aproximadamente entre el 15% y el 20% de todos los casos sufren de recaída (5). Del total de pacientes pediátricos que experimentan recaída de la enfermedad por primera vez, alrededor del 11% fallece durante el desarrollo de la quimioterapia de inducción o una vez alcanzada la remisión completa de la enfermedad (6).

El monitoreo del porcentaje de células leucémicas durante o una vez finalizado el régimen de quimioterapia, es empleado para evaluar la respuesta al tratamiento y elegir el siguiente esquema terapéutico (7). En ese sentido, la detección de cantidades submicroscópicas de células leucémicas (cantidades por debajo del límite de la citomorfología, establecido en 5%), definida como enfermedad mínima residual (EMR), ha demostrado ser uno de los factores predictores más importantes del riesgo de recaída de los pacientes con LLA (8–11).

El valor de la EMR es determinado mediante pruebas de laboratorio, que incluyen la citometría de flujo y PCR dirigido a genes de fusión, en muestras de médula ósea o sangre periférica (12,13). Las muestras de médula ósea son las más empleadas para medir la EMR debido a que poseen una mayor sensibilidad en comparación con las muestras de sangre periférica (niveles de EMR 1000 veces mayores en médula ósea) (14). Sin embargo, el empleo de muestras derivadas de la médula ósea se ve limitado por la complejidad del procedimiento además del dolor y ansiedad que genera el procedimiento para la obtención de este tipo de muestra en niños (15); además de la necesidad de ayunar durante al menos 8 horas antes del procedimiento. Por otro lado, aproximadamente entre el 20% y el 37% de los casos de LLA pediátrica no exhiben genes de fusión frecuentes (16), lo cual limita la utilidad de las pruebas moleculares empleadas de manera rutinaria para la medición de la EMR, dirigidas a la cuantificación de las células leucémicas que presentan estas aberraciones.

Durante la última década, se ha descrito que secuencias cortas (~22 nucleótidos), no codificantes, de RNA, denominadas microRNAs, pueden ser secretadas en diferentes fluidos corporales (suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, etc.), incluyendo muestras no invasivas como la orina y la saliva (17). Asimismo, se ha observado que existe una desregulación en los niveles de microRNAs circulantes en pacientes con LLA en comparación con pacientes sanos (18,19). Esta desregulación también es observada durante la aplicación de la quimioterapia en función de la respuesta al tratamiento, lo cual indica un rol preponderante no sólo en el desarrollo de esta enfermedad, sino también en su evolución (18,19). En general, se ha planteado que algunos microRNAs actuarían como oncogenes o genes supresores de tumores, mediante el silenciamiento de la traducción de transcritos (mRNAs) de genes supresores de tumores y oncogenes, respectivamente (20). Esta acción se realiza a

través de la unión completa o parcial de la secuencia de microRNA a la región 3' del transcrito, lo cual, a su vez, conllevaría la degradación de la molécula de mRNA o la inhibición de la traducción por parte del ribosoma, respectivamente (21).

Previamente, se ha demostrado que los microRNAs circulantes en muestras de suero, plasma y médula ósea pueden ser empleados como biomarcadores para el diagnóstico y predicción del pronóstico en individuos diagnosticados con leucemia mieloide aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloide crónica y leucemia linfocítica crónica (22–25). En el campo de la LLA pediátrica, diversas secuencias de microRNAs extracelulares (miR-31, miR-128-3p, miR-107, miR-155, miR-124, miR-181, miR-100, miR-223, miR-103a, etc.), han sido detectadas en muestras de suero, plasma, sangre total y médula ósea, y evaluadas como biomarcadores para el diagnóstico de esta patología y monitoreo de la EMR, demostrando una elevada sensibilidad, especificidad y poder discriminatorio (18,19,26–31). Sin embargo, hasta el momento, no se ha descrito el perfil de expresión de microRNAs circulantes en muestras de saliva y orina, ni tampoco se ha evaluado la utilidad de estas secuencias como biomarcadores no invasivos de EMR en pacientes con LLA. Esto a pesar de haberse demostrado la expresión aberrante de ciertos microRNAs, en este tipo de muestras, en otros tipos de cáncer, incluyendo cáncer cervical, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello, cáncer colorectal, entre otros (32–35).

En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo principal evaluar la utilidad de los microRNAs circulantes en saliva y orina como biomarcadores de EMR en niños diagnosticados con LLA, atendidos en el Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja (INSN-SB). A fin de lograr este objetivo, inicialmente se identificaron secuencias expresadas diferencialmente entre pacientes con riesgo alto de recaída ($EMR \geq 10\%$) y

pacientes con un riesgo estándar-intermedio (EMR < 10%), en base al resultado de la citometría de flujo en el día 15 de la quimioterapia, empleando la técnica de secuenciación de RNAs pequeños (sRNA-Seq). Se decidió elegir el día 15 de quimioterapia como punto de análisis debido a que representa el momento más temprano para medir el riesgo de recaída del paciente de acuerdo al protocolo de tratamiento empleado en el INSN-SB.

Con el propósito de confirmar los resultados del sRNA-Seq, se llevó a cabo una validación técnica en las mismas muestras empleadas durante la fase exploratoria, empleando la técnica de RT-qPCR. Finalmente, la utilidad de los microRNAs como biomarcadores de EMR fue evaluada en un último grupo de pacientes mediante la determinación del área bajo la curva (AUC ROC), tomando como gold estándar los resultados de la citometría de flujo.

Los resultados sugieren que miR-223-2p podría ser un biomarcador potencial para la medición no invasiva de EMR en población pediátrica diagnosticada con LLA.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La recaída es la principal causa de fracaso del tratamiento en pacientes pediátricos con LLA. En los países de bajos ingresos, la tasa de recaída muy temprana, temprana y tardía alcanza el 35%, 40% y 25%, respectivamente (36). La alta incidencia de recaída se traduce en bajas tasas de supervivencia, que alcanzan valores del 36.3% a los 2 años de iniciar el tratamiento con intención curativa (36). Esta tasa es aún menor cuando la recaída se produce muy tempranamente (supervivencia a 2 años: 18.2%) (36). En ese sentido, el monitoreo de la respuesta al tratamiento mediante métodos sensibles, que sean capaces de detectar células leucémicas remanentes durante la aplicación de la quimioterapia, es fundamental a fin de predecir la recaída de la enfermedad y modificar el enfoque terapéutico actual del paciente.

Actualmente, el método empleado de forma rutinaria para monitorear la respuesta al tratamiento y, de esta forma, guiar las decisiones terapéuticas, es la determinación de la EMR, es decir, el número de células leucémicas detectables en muestras de médula ósea o sangre periférica mediante métodos más sensibles que los exámenes morfológicos (37). El monitoreo de la EMR durante o posterior a la quimioterapia se realiza mediante pruebas de citometría de flujo y moleculares; siendo las más sensibles, las pruebas moleculares (capaces de detectar hasta 1 célula leucémica en 100 000 células normales) (12).

Si bien el uso de muestras de sangre resulta más atractivo (por la menor invasividad del proceso de toma de muestras en comparación con las muestras de médula ósea), los niveles de EMR en muestras de sangre son significativamente menores (desde ~12 hasta 1000 veces más bajos) en comparación con muestras de médula ósea (14,38). Adicionalmente, se han observado resultados discordantes en los niveles de EMR medidos en sangre periférica y

médula ósea, entre los subtipos de LLA (LLA tipo B y tipo T), siendo más variables en el caso de la LLA tipo B (9,39). Únicamente, entre el 9% y 36%, de muestras de sangre y médula ósea pareadas provenientes de pacientes con LLA tipo B, concuerdan en resultados positivos para EMR (9,39).

Se ha demostrado que la obtención de aspirados de médula ósea produce dolor intenso a máximo, según la escala “Faces Pain Scale”, en aproximadamente un tercio de los pacientes pediátricos sometidos a este procedimiento (40). Por este motivo, este proceso es considerado como uno de los más dolorosos durante el desarrollo y tratamiento de la enfermedad (40). Asimismo, aunque son infrecuentes, la posibilidad de ocurrencia de eventos adversos asociados al procedimiento de obtención de la muestra es latente; estos incluyen la presencia de infecciones, dolor persistente, hemorragias, etc. (41). Adicionalmente, se ha observado que la realización de procedimientos médicos invasivos en pacientes pediátricos con leucemia produce estrés no sólo en éstos, sino también en sus padres (42). El estrés que se produce en los padres está asociado positivamente con la sensación de dolor y estrés en los pacientes (sensación de dolor: $r = 0.33$, $p < 0.01$; estrés: $r = 0.38$, $p < 0.05$) (42).

Por otro lado, se ha documentado que la recaída de la enfermedad puede darse como resultado de la persistencia de un subclon leucémico resistente a la quimioterapia, existente al momento del diagnóstico, pero no detectado mediante los métodos convencionales (43). Así, al comparar el patrón anormalidades en el número de copias (ANCs) en 13 muestras pareas recolectadas al momento del diagnóstico y recaída de la enfermedad, se observó que el 100% presentó cambios en el patrón inicial: el 8% adquirió nuevas ANCs al momento de

la recaída, el 38% adquirió nuevas ANCs y perdió lesiones observadas al diagnóstico; y el 54% retuvo, perdió y adquirió lesiones al momento la recaída (44).

Esta diferencia entre el perfil genético al diagnóstico y la recaída también ha sido observada para mutaciones somáticas (45). Al analizar 19 muestras pareadas recolectadas al diagnóstico y recaída de la LLA, se identificaron 69 mutaciones que se presentaban únicamente al diagnóstico y 95 mutaciones que se adquirieron al momento de la recaída. Asimismo, se identificó que 20 de las 95 mutaciones que se adquirieron al momento de la recaída estaban presentes en un nivel bajo (frecuencia alélica < 2%) al diagnóstico, y que, por el contrario, sólo 6 de las 69 mutaciones que se presentaron al diagnóstico fueron detectables al momento de la recaída.

En conjunto, los aspectos mencionados previamente al cambio en el patrón genético desde el diagnóstico hasta la recaída del paciente limitan el uso de las técnicas moleculares empleadas de forma rutinaria para el monitoreo de la EMR, las cuales están dirigidas a la detección y cuantificación exclusiva del gen de fusión detectado durante el diagnóstico de la enfermedad. En ese sentido, resulta fundamental evaluar nuevos métodos para el monitoreo de la EMR en pacientes pediátricos diagnosticados con LLA, que sean de carácter no invasivo y permitan determinar la presencia de células leucémicas remanentes independientemente de las aberraciones genéticas y/o cromosómicas que éstas exhiban.

1.2. JUSTIFICACIÓN

En el año 1993, el descubrimiento de las secuencias de RNA lin-4 y let-7, implicadas en la regulación del desarrollo larval de *Caenorhabditis elegans*, reveló la existencia de una familia de secuencias de RNA cortas (~19-22 nucleótidos), no codificantes, capaces de regular la expresión génica a nivel post-transcripcional, denominadas microRNAs (46,47). Nueve años más tarde, se evidenció una asociación entre la presencia de leucemia linfocítica crónica tipo B y la ausencia o subexpresión de ciertos microRNAs (miR-15 and miR-16-1), lo cual sugería un rol importante de estas secuencias en el desarrollo de cáncer (48). Posteriormente, en el año 2004, se evidenció que más del 50% de los genes que codifican los microRNAs están localizados en regiones asociadas con cáncer o sitios frágiles del genoma humano (49), lo cual confirmaba el papel fundamental de estas secuencias en el desarrollo de la enfermedad.

Durante los años posteriores, se demostró que ciertos microRNAs, denominados microRNAs extracelulares o circulantes, son liberados a la circulación a partir de células tumorales, pudiendo ser detectados y cuantificados en muestras suero y plasma (50,51). Asimismo, se evidenció una mayor liberación de estas secuencias a partir de células tumorales en comparación con células normales (cantidades ~25 veces mayores), y se confirmó que éstas podían ser empleadas para detectar individuos con cáncer (en este caso, con cáncer de próstata) (51). Además de estar presentes en suero o plasma, se ha documentado que ciertos microRNAs pueden ser encontrados en la saliva y orina (17), pudiendo ser empleados como biomarcadores no invasivos para el diagnóstico de diversos tipos de cáncer con alta precisión diagnóstica (AUCs de hasta 1). Estos tipos de cáncer

incluyen el cáncer cervical, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello, cáncer colorectal, entre otros (32–35).

En el campo de la LLA adulta y pediátrica, desde el año 2018 hasta la actualidad, diversos microRNAs circulantes han sido reportados en muestras de plasma, suero, sangre total y médula ósea (miR-32, miR-143, miR-101, miR-129, miR-132, miR-124, miR-31, miR-128-3p, miR-335-3p, miR-326, entre otros), y han sido evaluados como biomarcadores para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad (18,19,26–31,52–54). Estas investigaciones han demostrado que los microRNAs tienen un alto poder para discriminar entre individuos que padecen la enfermedad e individuos sanos, y entre individuos que tienen una EMR > 1% y < 1% el día 15 de quimioterapia, presentando valores de AUC de hasta 0.99 y 0.97 , respectivamente (19,53). La posibilidad de detectar microRNAs en muestras no invasivas como saliva y orina, sumado al alto poder discriminatorio que tienen estas secuencias para diferenciar entre estadios de la enfermedad, representa una ventaja importante para su aplicación en el seguimiento de EMR en LLA pediátrica.

Además de su alto poder discriminatorio, otra ventaja de utilizar los microRNAs como biomarcadores es su elevada estabilidad frente a la degradación por enzimas RNAsas, ciclos de congelación-descongelación y, en general, entornos hostiles (55,56). Glinge *et al.* demostraron que las concentraciones de microRNAs circulantes en sangre se mantuvieron estables a temperatura ambiente al menos 24 horas (55). De manera similar, la expresión de los microRNAs permaneció estable durante al menos 8 horas de perturbación física y después de 4 ciclos de congelación-descongelación (55). La elevada estabilidad de los microRNAs circulantes puede atribuirse a su encapsulamiento en vesículas (exosomas) o formación de complejos ribonucleoprotéicos (por ejemplo, con las proteínas Ago2 o

lipoproteínas de alta densidad) al momento de su liberación al medio extracelular (57). En particular, los microRNAs asociados a lipoproteínas de alta densidad (HDLs) han demostrado ser resistentes a la acción de RNAsas, permitiendo que su expresión permanezca estable por hasta 24 horas a temperatura ambiente y después de hasta 5 ciclos de congelación-descongelación (56). Esta propiedad de los microRNAs permite simplificar el proceso de recolección de la muestra, y al mismo tiempo, reducir los costos del análisis de estas secuencias al eliminar la necesidad de utilizar reactivos para la conservación de ácidos nucleicos.

Una ventaja adicional del uso de microRNAs como biomarcadores de cáncer, particularmente, durante el monitoreo de la EMR, es la capacidad que poseen de regular más de un gen de manera simultánea (58,59). En la LLA, se ha observado que un subtipo genético definido puede estar acompañado de alteraciones en otros genes (por ejemplo, deleciones en IKZF1), lo cual limita el empleo de los métodos moleculares de determinación de EMR actuales basados en el uso de PCR dirigido a la detección de una aberración genética individual (60). En ese sentido, el análisis de microRNAs podría superar las limitaciones de estos métodos al funcionar como un biomarcador de la presencia de células leucémicas independientemente del perfil genético del paciente, debido a la asociación de la expresión anormal de un determinado microRNA con el desarrollo de más de una lesión genética (61,62).

En conjunto, todas las características mencionadas previamente: la posibilidad de detección en muestras no invasivas (como la orina y la saliva), el alto poder para discriminar diferentes estados patológicos, la elevada estabilidad en ambientes hostiles, y la regulación de diversos genes de manera simultánea, hacen idóneo el empleo de microRNAs circulantes como

biomarcadores no invasivos para el monitoreo de EMR, sobre todo en poblaciones pediátricas.

Debido a que el perfil de microRNAs en saliva y orina no ha sido explorado previamente en pacientes diagnosticados de LLA, en este estudio se optó por aplicar una técnica de secuenciación masiva como sRNA-Seq a fin de identificar candidatos potenciales que pudieran ser validados mediante la técnica de RT. -qPCR.

2. OBJETIVOS

2.1. GENERAL

Evaluar la utilidad de los microRNAs circulantes en saliva y orina, mediante secuenciación y RT-qPCR, como potenciales biomarcadores de enfermedad mínima residual en pacientes con leucemia linfoblástica aguda, atendidos en el INSN – SB.

2.2. ESPECÍFICOS

1. Describir el perfil de expresión de microRNAs en muestras de saliva y orina de pacientes diagnosticados con LLA, que exhiban EMR $\geq 10\%$ empleando la técnica de sRNA-Seq (fase exploratoria).
2. Confirmar los resultados obtenidos en el ensayo de sRNA-Seq mediante ensayos de RT-qPCR individuales dirigidos a los microRNAs que exhiban los niveles de expresión más aberrantes (fase de validación técnica).
3. Determinar el desempeño de los microRNAs circulantes con los niveles de expresión más aberrantes en pacientes con LLA, mediante el valor del AUC ROC (fase de validación clínica).

3. MARCO TEÓRICO

3.1. INCIDENCIA Y MORTALIDAD DE LA LLA

De acuerdo al Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC), la tasa de incidencia estandarizada por edad de la leucemia en menores de 19 años es de 3.1 por 100 mil habitantes, a nivel mundial (63). Por otro lado, la tasa de mortalidad estandarizada por edad, es de 1.2 por 100 mil habitantes. A nivel del Perú, la tasa de incidencia estandarizada por edad es de 7.8 por 100 mil habitantes, mientras que la tasa de mortalidad, de 3.6 por 100 mil habitantes (63).

En cuanto a la LLA pediátrica específicamente, no existen reportes de incidencia y mortalidad en población peruana. Durante el período 2001-2014, se reportaron 38, 136 nuevos casos de esta enfermedad en Estados Unidos, con una tasa de incidencia ajustada por edad de 34 casos por millón de personas. La mayor tasa de incidencia, equivalente a 42.9 casos por millón de personas, se reportó en la población hispánica; seguida de la tasa de incidencia para la población no hispánica blanca y no hispánica negra (34.2 y 18.7 casos por millón de personas, respectivamente). Con respecto al grupo etario, la mayor tasa de incidencia se registró para el grupo de 1-4 años (75.2 casos por millón de personas); mientras que la menor, para el grupo de 15-19 años (17 casos por millón de personas) (2).

A nivel del Perú, el último reporte de incidencia y mortalidad de cáncer elaborado por el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas indica una incidencia de leucemia en general, de 78.44 por millón de personas durante el periodo 2013-2015. En cuanto a la incidencia de la leucemia linfoblástica específicamente, la tasa más alta se concentra en el grupo etario de 1-4 años (76.77 casos por millón de personas); mientras que la menor, en el

grupo etario de menores de 1 año (19.18 casos por millón de personas). Por otro lado, en lo que respecta a la tasa de mortalidad, ésta es más alta en el grupo etario de 5-9 años (25.84 muertes por millón de personas), y más baja en el grupo etario de menores de 1 año (4.68 muertes por millón de personas) (3).

La tasa de sobrevivencia es significativamente mayor en países desarrollados en comparación a países en vías de desarrollo. Por ejemplo, a nivel de Centroamérica y América del Sur, la tasa de sobrevivencia a 5 años oscila entre 53.8% y 80.1%; mientras que, en Norteamérica, específicamente, en Canadá y Estados Unidos, ésta es de 90.6% y 87.7%, respectivamente (4). En el Perú, la sobrevivencia general a 5 años se ha estimado en 32.5%, mientras que la sobrevivencia libre de enfermedad, en 66.1% (64).

3.2. TRATAMIENTO DE LA LLA

El tratamiento de casos nuevos de LLA está basado en la aplicación de quimioterapia, la cual se divide en 3 fases: inducción de la remisión, consolidación y mantenimiento (5). La inducción de la remisión, cuyo objetivo es eliminar completamente las células leucémicas y restaurar el proceso normal de hematopoyesis, constituye la fase inicial del tratamiento con quimioterapia y posee una duración aproximada de 4 a 6 semanas (5). En general, el régimen de inducción se basa en el empleo de corticosteroides (dexametasona o prednisona), vincristina y asparaginasa, además de la adición de una antraciclina (doxorubicina o daunorubicina) (5).

La fase de inducción de la remisión es seguida de la fase de consolidación, en ésta el paciente recibe un tratamiento dirigido a erradicar los residuos restantes de células leucémicas (5). Esta fase de la quimioterapia posee una duración aproximada de 4 a 6 meses e involucra la combinación de diferentes agentes quimioterapéuticos, distintos a los empleados en la fase

de inducción, incluyendo la mercaptopurina, tioguanina, metotrexato, ciclofosfamida, etopósido y citarabina (5). Si bien la duración e intensidad del esquema empleado en esta fase varía entre protocolos, en general, los pacientes que exhiben un riesgo alto reciben regímenes más intensos y más largos (65).

La fase de mantenimiento representa la etapa final del tratamiento basado en quimioterapia. Ésta está dirigida a evitar la recaída del paciente una vez que se ha logrado la remisión completa de las células leucémicas y tiene una duración de al menos 2 años luego del alta del paciente (5). Los agentes terapéuticos empleados durante la etapa de mantenimiento incluyen el metotrexato y mercaptopurina; estos fármacos son administrados vía oral, lo cual hace necesaria la adherencia completa al tratamiento a fin de evitar la aparición de la recaída de la enfermedad (5).

Un componente adicional del tratamiento de la LLA se basa en la aplicación de una terapia dirigida al sistema nervioso central (SNC). Todos los protocolos de tratamiento incluyen la administración intratecal de fármacos quimioterápicos como el metotrexato de forma individual o la combinación de metotrexato intratecal, citarabina e hidrocortisona (terapia triple intratecal), durante la fase de inducción (5). Otra de las vías para la administración de la terapia dirigida al SNC es la vía sistémica; los fármacos que son administrados mediante esta vía incluyen la dexametasona, metotrexato a altas dosis, citarabina y asparaginasa (5).

3.3. MONITOREO DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO MEDIANTE LA MEDICIÓN DE LA EMR

A fin de evaluar la respuesta al tratamiento y determinar el riesgo de recaída de la enfermedad, el número de células leucémicas presentes en la médula ósea es cuantificado

durante y una vez finalizada el tratamiento con quimioterapia, empleando pruebas fenotípicas (citometría de flujo) o genotípicas (PCR) (13). La presencia de este grupo remanente de células leucémicas se define como EMR, y su detección constituye uno de los factores predictores de recaída más importantes en la LLA pediátrica (8–11).

La inclusión de la EMR en el día 15 de quimioterapia en el protocolo de manejo clínico de LLA como factor para definir el riesgo de recaída de la enfermedad ha permitido ampliar las posibilidades de sobrevida de los pacientes (66). En base a este valor, los pacientes son estratificados en el grupo de riesgo de recaída estándar ($EMR < 0.1\%$), el grupo de riesgo intermedio ($EMR \geq 0.1\% - < 10\%$) y el grupo de riesgo alto ($EMR \geq 10\%$) (67). Los pacientes que presentan una $EMR < 0.1\%$ en este punto de la quimioterapia exhiben una sobrevida libre de recaída significativamente mayor que aquellos que presentan una $EMR > 0.1\%$ (96.2% vs 80.5%, $p = 0.027$), lo que confirma el papel crucial de este factor en la valoración del riesgo de recaída, y por tanto, de las chances de sobrevida del paciente (67).

El valor pronóstico de la EMR depende de que las técnicas de cuantificación empleadas puedan detectar hasta 1 célula leucémica en 10, 000 mil normales (13). Actualmente, las técnicas más empleadas para el monitoreo de la EMR incluyen la citometría de flujo (multiparamétrica) y el PCR dirigido a la detección de genes de fusión o rearrreglos en los genes de las inmunoglobulinas y el receptor de células T (rearrreglos IG/TR) (12).

La citometría de flujo permite la identificación de los marcadores antígenos presentes en la superficie de los linfocitos, y con esto, la diferenciación de las células con fenotipos normales de las células leucémicas (13). Previamente, se ha demostrado que la citometría de flujo de 4 colores puede permitir la detección de hasta 1 célula leucémica en 10, 000

células normales (límite de detección = 0.01%), mientras la citometría de flujo de 8-12 colores, de hasta 1 células leucémica en 100, 000 células normales (límite de detección = 0.001%)(12,13). Si bien la citometría de flujo posee la ventaja de otorgar resultados en un corto periodo de tiempo (3-4 horas), ésta presenta diversas desventajas que limitan su empleo, incluyendo la necesidad de procesar las muestras recolectadas en un corto periodo de tiempo a fin de evitar la muerte celular, la posibilidad de detectar células linfoides normales que coexpresan algunos antígenos de tipo LLA (lo cual puede dar lugar a resultados falsos positivos), la posibilidad de errores o interpretaciones difíciles debido a un cambio fenotípico, entre otras (12).

El límite de detección de la citometría de flujo es superado por la técnica de PCR, la cual posee un límite equivalente a 0.001% (1 célula leucémica en 100, 000 células normales) (13). Comúnmente, el PCR está dirigido a la detección de rearrreglos IG/TR; estos rearrreglos representan una “huella de ADN” que es transmitida de un progenitor linfoide a su progenie celular (13). Esta “huella de ADN” es identificada al diagnóstico mediante PCR y secuenciación, y es empleada para diseñar primers específicos que son posteriormente empleados durante el monitoreo de la EMR (12). La mayor desventaja de la aplicación de esta técnica está asociada con que los rearrreglos IG/TR no están necesariamente asociados con procesos oncogénicos; en consecuencia, las células leucémicas que se analizan durante el tratamiento pueden presentar rearrreglos diferentes a lo largo del tiempo (lo cual, a su vez, puede dar lugar a resultados falsos negativos) (13).

Otros de los blancos empleados para la cuantificación de la EMR mediante PCR son los genes de fusión detectados al momento del diagnóstico de la enfermedad. Debido a que la generación de genes de fusión es uno de los eventos impulsores de la LLA, éstos se expresan

en todas las células leucémicas y permanecen estables durante la progresión de la enfermedad (12). A diferencia del PCR dirigido a los rearrreglos IG/TR, el PCR dirigido a los genes de fusión no emplea primers diseñados en base al patrón de ADN de cada individuo; en cambio, toma ventaja del transcrito de RNA que se genera en todos los pacientes que exhiben un determinado rearrreglo, para poder emplear un mismo set de primers que permita identificar dicho rearrreglo mediante la técnica de RT-qPCR (12). La mayor ventaja del PCR dirigido a genes de fusión es que no es una técnica específica del paciente; además, es relativamente fácil de realizar y no es costosa (12). Sin embargo, su utilidad en el diagnóstico de LLA se ve limitada principalmente debido a que más del 50% de los casos que son detectados entre 1 y 19 años no exhibe los genes de fusión más comunes que son analizados durante las pruebas moleculares rutinarias, lo cual puede llevar a un resultado falso negativo (68).

Previamente, se ha comparado la sensibilidad de las muestras derivadas de la médula ósea y las muestras de sangre periférica para el monitoreo de la EMR, determinándose que el nivel de EMR en las primeras es entre 10 a 1000 veces mayor en comparación con las segundas (14,69). En tal sentido, la adecuada determinación de la EMR debe basarse en el empleo de muestras derivadas de la médula ósea.

3.4. BASES GENÉTICAS DE LA LLA

En general, el proceso de transformación maligna de las células linfoides se atribuye a la presencia de aberraciones citogenéticas que conducen a reordenamientos genéticos; sin embargo, estos cambios por sí solos no son suficientes para inducir el desarrollo de la enfermedad (1). La figura 1 muestra las anormalidades genéticas y citogenéticas involucradas en el desarrollo de la LLA-B, mientras que la tabla 1 describe el pronóstico

clínico de las principales anomalías observadas en niños menores de 15 años. El gen de fusión ETV6-RUNX1 y la hiperdiploidía alta representan aproximadamente el 50 % de las anomalías genéticas que caracterizan a la LLA-B (70). Otra anomalía observada en aproximadamente el 3% de los casos de LLA-B es la amplificación intracromosómica del cromosoma 21 (iAMP21) (70).

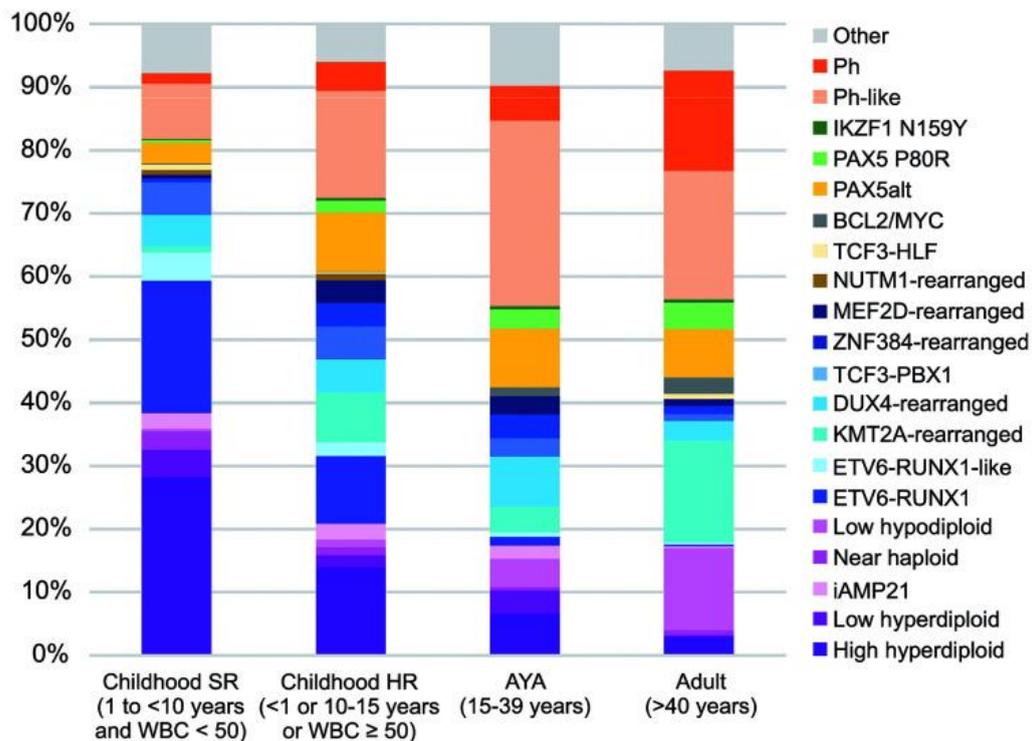


Figura 1. Frecuencia de los diferentes subtipos genético moleculares y citogenéticos en LLA pediátrica.

Imagen extraída de Inaba y Mullighan (71).

Tabla 1. Prevalencia y pronóstico de subtipos genéticos de la LLA-B

Aberración	Frecuencia	Pronóstico
Hiperdiploidía alta (>50 cromosomas)	~25%	Favorable
Hipodiploidía baja (31-39 cromosomas)	<1%	Desfavorable
Casi haploidía	~2%	Desfavorable
ETV6-RUNX1	25%	Favorable
Rearreglos de KMT2A	4%*	Desfavorable
TCF3-PBX1	~5%	Favorable
BCR-ABL1	2-5%	Favorable con inhibidores de tirosina-quinasa
BCR-ABL1 like	10-15%	Desfavorable

* Frecuencia en individuos entre 15 y 39 años. Su presencia es una característica distintiva de la LLA en menores de 1 año. Información extraída de Roberts (70).

El análisis del transcriptoma completo ha permitido identificar nuevos subtipos genéticos de LLA-B caracterizados por un perfil de expresión e inmunofenotipo similar al de ETV6-RUNX1 (ETV6-RUNX1-like), traslocación de DUX4, rearrreglos de ZNF384, rearrreglos de MEF2D, rearrreglos de NUTM1 y alteraciones en el factor de transcripción PAX 5 (subtipos PAX5alt y PAX5 P80R) (71).

En el caso de LLA-T, las anomalías genéticas incluyen principalmente alteraciones en vías implicadas en la expresión de factores de transcripción del linaje T, la señalización NOTCH1/MYC y el control del ciclo celular (71). Los factores de transcripción alterados en la LLA-T incluyen a TAL1, TAL2, TLX1, TLX, HOXA, LMO1/LMO2, LMO2/LYL1 y NKX2-1. Las alteraciones en TAL1, HOXA y TLX3 son las más comunes en la LLA-T pediátrica y representan aproximadamente el 30%, 20% y 15% de los casos, respectivamente (72).

3.5. BIOGÉNESIS DE LOS MICRORNAS Y ROL EN EL PROCESO DE HEMATOPOYESIS

La formación de los microRNAs se basa en un proceso que inicia con la conversión, mediada por la enzima ribonucleasa III de clase 2, DROSHA, de un transcrito de microRNA primario, denominado pri-miRNA (de ~ 1000 nucleótidos), a un microRNA precursor (de 60-120 nucleótidos) que contiene una estructura en forma de horquilla con un “overhang” de 2 nucleótidos en el extremo 3’. Este ‘overhang’ es reconocido por la Exportina 5 y el microRNA precursor es transportado desde el núcleo al citoplasma para ser procesado por la endoribonucleasa Dicer y formar el duplex de microRNA maduro (de 19-25 nucleótidos). Finalmente, la hebra 3’ o 5’ del duplex es insertada en la proteína Argonauta para formar el complejo de silenciamiento inducido por microRNA, RISC (21).

El complejo RISC puede actuar sobre los RNAs mensajeros (mRNA), principalmente, mediante la unión completa o parcial de la secuencia de microRNA a las regiones no traducidas del extremo 3', la cual conduce a la aceleración de la degradación del mRNA o a la inhibición de la traducción, respectivamente (21). La unión parcial del microRNA con la molécula de mRNA se debe a la presencia de un bucle en el centro de la secuencia de microRNA, que ocasiona la ausencia de una complementariedad total entre ambas secuencias (73). Los genes que codifican a los microRNAs pueden verse alterados por procesos de activación transcripcional y metilación, así como por aberraciones que incluyen duplicaciones, deleciones y cambios en la secuencia; esta alteración conduce a una desregulación de su acción, pudiendo ejercer un rol como promotores o supresores de tumores (21).

En el caso específico de la LLA, el desarrollo en la médula ósea y activación en la periferia de los linfocitos T y B, como parte del proceso de hematopoyesis, están controlados por vías de señalización proteicas, que a su vez, están reguladas por microRNAs (74–76). Los microRNAs involucrados en el desarrollo normal de la hematopoyesis incluyen al miR-150, miR-155, miR-181a, y el cluster miR-17-92 (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 y miR-92-1) (77).

Cada una de estas secuencias cumple un rol específico a nivel de la regulación del proceso de hematopoyesis. Por ejemplo, miR-150 es expresado por las células progenitoras linfoides para inducir la transformación de estas células en células B maduras, regulando la transición del estadio celular pro-B al estadio celular pre-B, la transición del estadio pre-B al estadio maduro, o la diferenciación de la célula B madura en la subclase B1 (77). Una

sobreexpresión prematura de este microRNA resulta en la inhibición de la transición desde el estadio pro-B al estadio pre-B (78). A nivel del timo, la expresión del miR-150 induce el desarrollo de las células T (por ejemplo, a través de la promoción de la transición del estadio doble negativo 3 a doble negativo 4) y suprime la diferenciación de las células progenitoras en otros linajes celulares (79–82).

Al igual que el miR-150, el cluster miR-17-92 juega un rol importante en la regulación de la transición de las células B desde el estadio pro-B al estadio pre-B (77). Sin embargo, a diferencia del miR-150, el mecanismo de regulación del cluster miR-17-92 sobre la maduración de las células B se da a nivel del incremento de la expresión de la proteína proapoptótica BIM (83).

Por otro lado, el miR-155 se encarga de regular el proceso de diferenciación de las células T en células T colaboradoras (T helper) y reguladoras (77). En presencia de este microRNA, las células T se diferencian principalmente en células T helper 1; mientras que, en su ausencia, las células T se diferencian directamente en células T helper 2 (84–86). Adicionalmente, la diferenciación de las células progenitoras linfoides en células B (específicamente, de las células B maduras en el subtipo B2) está regulada por el miR-155; esto mediante la inhibición de la expresión del factor de transcripción PU.1. (77,87).

Otro de los microRNAs involucrados en el proceso de leucemogénesis es el miR-181a. Esta secuencia juega un rol importante tanto en la transición de las células B desde el estadio pre-B al estadio maduro, como en la transición de las células T desde el estadio de células T doble-negativas al estadio de células T doble-positivas (77). Los blancos de este microRNA

incluyen los genes que codifican las proteínas Bcl-2, CD69, EGR1 y el receptor de células T (88–90).

3.6. MICRORNAS CIRCULANTES: GENERALIDADES

La identificación de microRNAs circulantes en individuos con cáncer fue realizada por primera vez en pacientes con linfoma difuso de células B grandes, en los cuales se evidenció una mayor expresión del miR-155, miR-210 y miR-21 en comparación con individuos sanos (50). Este descubrimiento abrió la posibilidad del empleo de muestras menos invasivas, como la sangre, para el diagnóstico y predicción de la prognosis de diversos tipos de cáncer pediátrico, incluyendo el neuroblastoma, osteosarcoma, rhabdomyosarcoma, leucemia, retinoblastoma y el tumor de Wilms (91).

Uno de los principales atractivos de estos microRNAs es su elevada estabilidad frente a la aplicación de ciclos de congelación-descongelación y exposición prolongada a temperatura ambiente, así como su resistencia a la acción de RNAsas; esto debido a que son empacados y transportados en vesículas lipídicas asociadas con proteínas de unión a RNA que los protegen de la degradación, denominados exosomas (51,92). Adicionalmente, la inclusión de los microRNAs circulantes en HDLs o su unión en la parte exterior de vesículas mediante el anclaje de la proteína Ago2 son otros de los mecanismos descritos que previenen la degradación de estas moléculas por RNAsas (93,94).

En cuanto a su mecanismo de acción, se ha sugerido que los microRNAs circulantes pueden actuar como hormonas, enviando señales codificadas genéticamente a células vecinas o distantes (91). Por ejemplo, en el caso del cáncer colorectal, se ha documentado que las células tumorales liberan el miR-1246 al ambiente extracelular como señal para la

estimulación de la angiogénesis, mediante la activación de la vía Smad 1/5/8 en las células endoteliales (95). Por otra parte, en el caso del cáncer de pulmón, se ha indicado que los efectos prometastásicos de los microRNAs exosomales miR-21 y miR-29 son consecuencia de la unión como ligandos de estas secuencias a receptores extracelulares de la familia tipo Toll (Toll-like receptors) localizados en macrófagos (96). Adicionalmente, se ha sugerido que los microRNAs circulantes tendrían la habilidad de transformar células no tumorales en células tumorales e inducir la proliferación celular, mediante un mecanismo dependiente de la enzima Dicer (97).

Con respecto a la cantidad de microRNAs circulantes presentes en saliva y orina, se ha documentado que la concentración en muestras provenientes de individuos sanos es de 25.33 ng/ μ l y 6.60 ng/ μ l, respectivamente (98). Por otro lado, se ha demostrado que la cantidad de exosomas liberados por células cancerígenas puede ser entre 8 a 23 veces mayor en comparación con células sanas, lo cual sugeriría que la cantidad de microRNAs circulantes en sujetos con cáncer sería significativamente mayor en comparación con sujetos sanos (99).

4. METODOLOGÍA

4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio estuvo compuesta por pacientes atendidos en el Servicio de Hematología de la Sub-Unidad de Atención Integral Especializada al Paciente de Progenitores Hematopoyéticos del INSN–SB durante el período comprendido entre julio del 2022 y abril del 2024.

4.2. DISEÑO DEL ESTUDIO

El presente estudio tuvo un diseño observacional, analítico, de corte transversal. El flujo general de actividades que fueron realizadas a fin de alcanzar el objetivo principal se muestra en la figura 2 y se detalla en los siguientes párrafos.

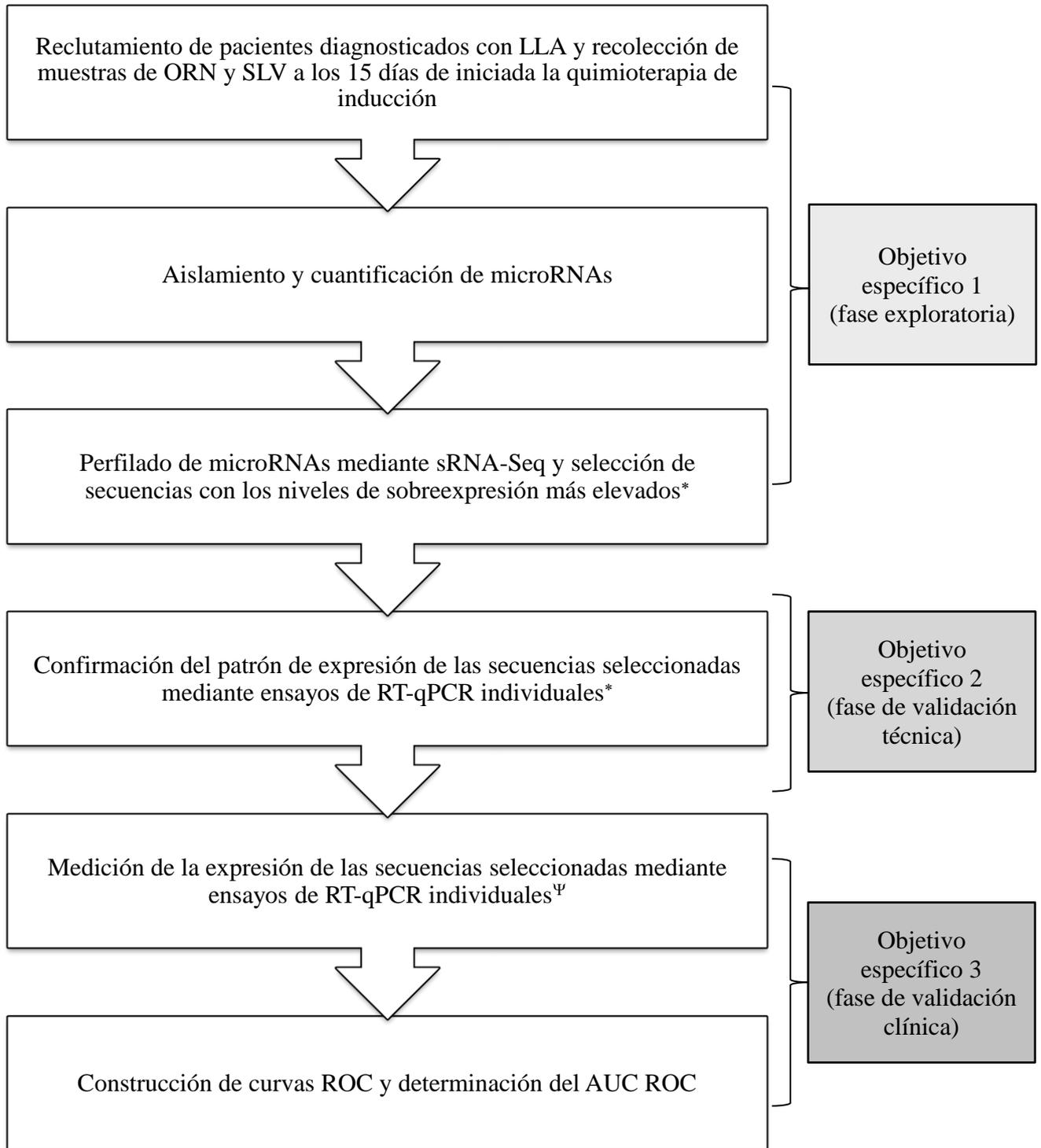


Figura 2. Flujo general de trabajo

* primer grupo de pacientes; ^ψ segundo grupo de pacientes.

El estudio se dividió en 3 fases: 1) fase exploratoria, 2) fase de validación técnica y 3) fase de validación clínica. A lo largo del estudio, se reclutaron pacientes diagnosticados con LLA que estaban próximos recibir la quimioterapia de inducción y se los dividió en dos grupos según la fase del estudio en la que se analizarían sus muestras. Las muestras recolectadas del primer grupo de pacientes se utilizaron para llevar a cabo la fase exploratoria y la fase de validación técnica, mientras que las muestras recolectadas del segundo grupo se utilizaron únicamente para llevar a cabo la fase de validación clínica.

La recolección de las muestras fue realizada a los 15 días luego de iniciada la quimioterapia de inducción. La elección de este punto de monitoreo de la EMR se basa en los hallazgos de publicaciones previas en los que se indica que la medición temprana de este parámetro (a los 15 días de iniciada la quimioterapia de inducción) permite predecir de manera independiente la recaída del paciente (100).

El resultado de la medición de EMR fue categorizado en $EMR \geq 10\%$ y $EMR < 10\%$, en base a los resultados de la prueba de citometría de flujo, realizada de forma rutinaria en el INSN-SB en el punto de monitoreo elegido. El grupo de riesgo correspondiente a cada categoría se muestra en la tabla 2 (101–103).

Tabla 2. Definición de las categorías para el resultado de medición de la EMR

Categoría	Grupo de riesgo
% de blastos \geq 10%	Riesgo alto*
% de blastos $<$ 10%	Riesgo estándar-intermedio

*Requerimiento de trasplante de progenitores hematopoyéticos

Durante la fase exploratoria, se realizó un perfilado de microRNAs mediante la técnica de sRNA-Seq en pacientes que exhibían EMR \geq 10% a los 15 días de iniciada la quimioterapia de inducción (grupo de referencia) y pacientes que exhibían EMR $<$ 10% (grupo control) en este mismo punto de monitoreo, con el objetivo de identificar secuencias expresadas diferencialmente entre estos grupos.

La fase de validación técnica fue realizada con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos en el ensayo de sRNA-Seq con respecto al patrón de expresión de los microRNAs. Durante esta etapa, los 3 microRNAs que exhibieron los niveles de sobreexpresión más elevados de acuerdo a los resultados del secuenciación fueron analizados mediante ensayos de qRT-PCR individuales.

Finalmente, durante la fase de validación clínica, se midió la expresión de los 3 microRNAs previamente seleccionados mediante ensayos de RT-qPCR individuales, empleando muestras de pacientes incluidos en la fase exploratoria y un nuevo grupo. La utilidad de estas secuencias como biomarcadores de EMR en el día 15 de quimioterapia fue evaluada mediante el cálculo del AUC ROC, tomando como patrón de referencia (gold estándar) al resultado de la prueba de citometría de flujo en muestras de médula ósea.

4.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN O EXCLUSIÓN

Criterios de inclusión:

- Pacientes nuevos, atendidos en el Servicio de Hematología del INSN-SB durante el período comprendido entre julio del 2022 y abril del 2024.
- Pacientes menores de 18 años de edad.
- Pacientes diagnosticados con LLA mediante frotis de médula ósea y/o sangre periférica y pruebas de citometría de flujo.
- Pacientes diagnosticados con LLA referidos de otras instituciones a nivel nacional para iniciar su tratamiento en el INSN-SB.
- Pacientes que no alcanzaron el día 15 de la quimioterapia hasta el momento de la toma del asentimiento y/o consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- Pacientes pediátricos diagnosticados con tipos de leucemia diferentes de la LLA.
- Pacientes que presentaron niveles elevados de glóbulos blancos a causa de cuadros inflamatorios o infecciosos.
- Pacientes que presentaron trombocitopenia a causa de enfermedades autoinmunes o trastornos hereditarios de la médula ósea.
- Pacientes que presentaron niveles bajos de glóbulos rojos a causa de deficiencia de hierro, deficiencia de vitaminas, inflamación, aplasia, enfermedades de la médula ósea diferentes de la leucemia o hemólisis.

4.4. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

A continuación, se muestran los cálculos de tamaño de muestra realizados para cada fase del estudio. Todos los cálculos de tamaño de muestra planteados fueron realizados en el

Software R Studio (v 4.3.1). Las fórmulas matemáticas para el cálculo manual se indican en el Anexo 5.

Es importante considerar que el tamaño de muestra alcanzado en cada fase del estudio estuvo influenciado por la casuística de pacientes del grupo de riesgo alto y la disponibilidad de muestras de saliva.

Según estadísticas internas del INSN-SB, anualmente se tratan un promedio de 60 casos de LLA, de los cuales aproximadamente el 33% presenta una EMR $\geq 10\%$ (20 pacientes).

Además, debido al miedo que generan los procesos médicos rutinarios en los niños hospitalizados, los pacientes pueden optar por no cooperar con la toma de muestras de saliva, a pesar de ser un proceso no invasivo.

4.4.1. FASE EXPLORATORIA Y FASE DE VALIDACIÓN TÉCNICA

Los tamaños de muestra propuestos para la fase exploratoria fueron calculados empleando la fórmula propuesta por Hant *et al.* (104) para estudios en los que se emplea la técnica de RNA-Seq (tabla 3). Se consideró un coeficiente de variación (CV) de 0.43, diferentes grados del cambio de la expresión (fold change) de un determinado microRNA en el día 15 posterior al inicio de la quimioterapia de inducción (18), un nivel de confianza del 95% y una potencia estadística de 80%. El valor del CV utilizado correspondió a la mediana obtenida a partir del análisis de diferentes muestras humanas analizadas mediante la técnica de RNA-Seq (104).

Como se muestra en la tabla 3, el número máximo de pacientes calculado para esta fase fue de 11 por grupo, lo que permitiría detectar un cambio en la expresión de hasta 0.52.

Tabla 3. Tamaños de muestra estimados para la fase exploratoria

Grado de variación (Log ₂ fold change*) (18)	Tamaño de muestra
0.52	11
1.98	10
2.05	9
4.24	3

En el caso de la fase de validación técnica, se optó por realizar esta evaluación en el mismo grupo de pacientes analizados durante la fase exploratoria.

4.4.2. FASE DE VALIDACIÓN CLÍNICA

Los tamaños de muestra propuestos para la fase de validación clínica fueron calculados en base a un determinado valor de AUC ROC debido a que esta medida permite evaluar la precisión diagnóstica de una determinada prueba, y por tanto, su utilidad clínica. Los valores de AUC propuestos fueron extraídos de la publicación de Rzepiel *et al.* (18), quienes evaluaron la utilidad de los microRNAs circulantes en plasma para el monitoreo de la EMR en el día 15 de la quimioterapia. Se consideró un nivel de confianza del 95% y una potencia estadística de 80% para todos los cálculos realizados.

Como se muestra en la tabla 4, el número máximo de pacientes calculado para esta fase fue de 29 por grupo, que permitiría alcanzar un AUC de 0.707.

Tabla 4. Tamaños de muestra estimados para la fase de validación clínica

Valor de AUC ROC	Tamaño de muestra
0.707	29
0.8	13
0.9	7

4.5. RECLUTAMIENTO DE PACIENTES Y RECOLECCIÓN DE DATOS

Se invitó a participar en el estudio a todos los pacientes a los que el médico tratante les solicitó un frotis de médula ósea y/o sangre periférica y una prueba de citometría de flujo, y sus padres o apoderados.

El proceso de enrolamiento fue llevado a cabo en el Área de Hospitalización del Servicio de Hematología del INSN-SB, de forma posterior a la obtención de los resultados de las pruebas indicadas previamente, y un día antes de la toma de muestra programada para el día 15 de la quimioterapia de inducción.

Como parte del proceso de enrolamiento, inicialmente se realizó una explicación del estudio y del contenido del asentimiento y/o consentimiento informado al paciente y/o sus padres o apoderados. Luego, se resolvieron las dudas que surgieron con respecto a estos documentos y se procedió a la firma de los mismos, sólo una vez que el paciente y/o el padre brindasen su aprobación para participar en la investigación.

Adicionalmente, se llenó una ficha conteniendo datos sociodemográficos y clínicos del paciente (Anexo 4), tomando como fuentes de información la historia clínica y/o los informes de laboratorio, donde se asignó un código de identificación para el proyecto a cada participante.

4.6. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de orina fueron recolectadas empleando frascos estériles de 100 ml (Samplix, Lima, Perú). Se recolectaron 20 ml de la primera muestra de la mañana por paciente.

Por otro lado, la recolección de saliva fue realizada empleando el hisopo acoplado dispositivo Salivette® (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se emplearon 2 hisopos por paciente a fin de obtener la mayor cantidad de muestra posible.

4.7. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Luego de la recolección, las muestras fueron centrifugadas a 4,800 x g durante 15 minutos, a 4°C, a fin de eliminar el debris celular. A partir del sobrenadante, se realizaron alícuotas de 2 ml y 350 µl de las muestras de saliva y orina, respectivamente.

Durante la fase exploratoria se utilizaron tres alícuotas de 350 µl de saliva y orina para el aislamiento de microRNAs con el fin de obtener una cantidad suficiente de RNA para realizar el secuenciación. Por otro lado, durante la fase de validación en saliva sólo se utilizó una alícuota de 350 µl ya que con este volumen mínimo de muestra se pudo obtener una cantidad suficiente de RNA para realizar la RT-qPCR.

Las otras alícuotas de 2 ml fueron almacenadas en una congeladora a – 70°C ubicada en el laboratorio N° 6 de la Sub Unidad de Investigación e Innovación Tecnológica (SUIIT), para su empleo en futuras investigaciones relacionadas a la enfermedad de estudio.

Los microRNAs fueron aislados empleando el kit mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion Inc., Texas, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante. El RNA fue eluído en 20 µl del buffer de elución contenido en el kit.

Durante la extracción, se añadieron 10 µl de un control exógeno proveniente de *C.elegans* (cel-miR-39) a la muestra, con el fin de verificar que el proceso de extracción se había realizado adecuadamente. Se realizaron ensayos para determinar la concentración de control exógeno que permitiera alcanzar un Cq entre 20 y 25.

Inicialmente, se prepararon 3 diluciones de cel-miR-39 a partir de una solución madre que contenía 50 µmol/l. Las diluciones tuvieron una concentración final de 0.0002 µmol/l, 0.002 µmol/l y 0.02 µmol/l del control y se llevaron a cabo en buffer TE pH 8,0 (Ambion Inc., Texas, EE. UU.). Luego, se agregaron 10 µl de cada dilución para obtener una concentración final de cel-miR-39 de 5.71 pmol/l, 57.14 pmol/l y 571.43 pmol/l, a 3 alícuotas de 4 muestras provenientes de diferentes pacientes. El volumen de las alícuotas fue de 350 µl cada una.

Este primer paso se realizó con el objetivo de establecer dos concentraciones que permitieran obtener el rango de Cqs previamente indicado. Las dos concentraciones elegidas se utilizaron en 4 muestras adicionales. La detección de este microRNA se realizó mediante RT-qPCR, utilizando la metodología descrita en el apartado 4.11.

4.8. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD Y PUREZA DEL RNA AISLADO

La concentración de RNA se determinó mediante el método de fluorimetría empleando el kit Qubit™ RNA HS Assay (Invitrogen™, California, EE.UU.) y el equipo Qubit™ 4 (Invitrogen™, California, EE.UU.). La pureza del RNA extraído se determinó mediante la técnica de espectrofotometría, empleando el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EE.UU.). Se utilizó un ratio de 260/280 de aproximadamente 2.0 para definir una muestra de RNA como pura (105).

La calidad del RNA aislado no fue evaluada en un bioanalizador debido a que no se espera que el RNA ribosómico (rRNA) esté presente en la fracción libre de células de la orina o saliva, por lo que el cálculo del ratio rRNA 28S: 18S y el número de integridad del RNA (RIN) no es aplicable (106).

4.9. PERFILADO DE MICRORNAS MEDIANTE sRNA-SEQ Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Las muestras de RNA que contaban con una concentración mayor a 10 ng/μl en un volumen de elución de 20 μl, fueron enviadas a las compañías MacroGen y CD Genomics de los Estados Unidos para la preparación de las librerías y la secuenciación de RNAs pequeños en el equipo Illumina Novaseq 6000 (California, EE.UU.). La secuenciación se realizó utilizando lecturas de extremos emparejados de 2x150 pb para obtener aproximadamente 20

M de lecturas por muestra (10 millones en cada dirección). Las librerías de secuenciación se construyeron con el kit QIAseq miRNA Library (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo el protocolo del fabricante. El flujo de pasos del análisis bioinformático se detalla en la figura 3.

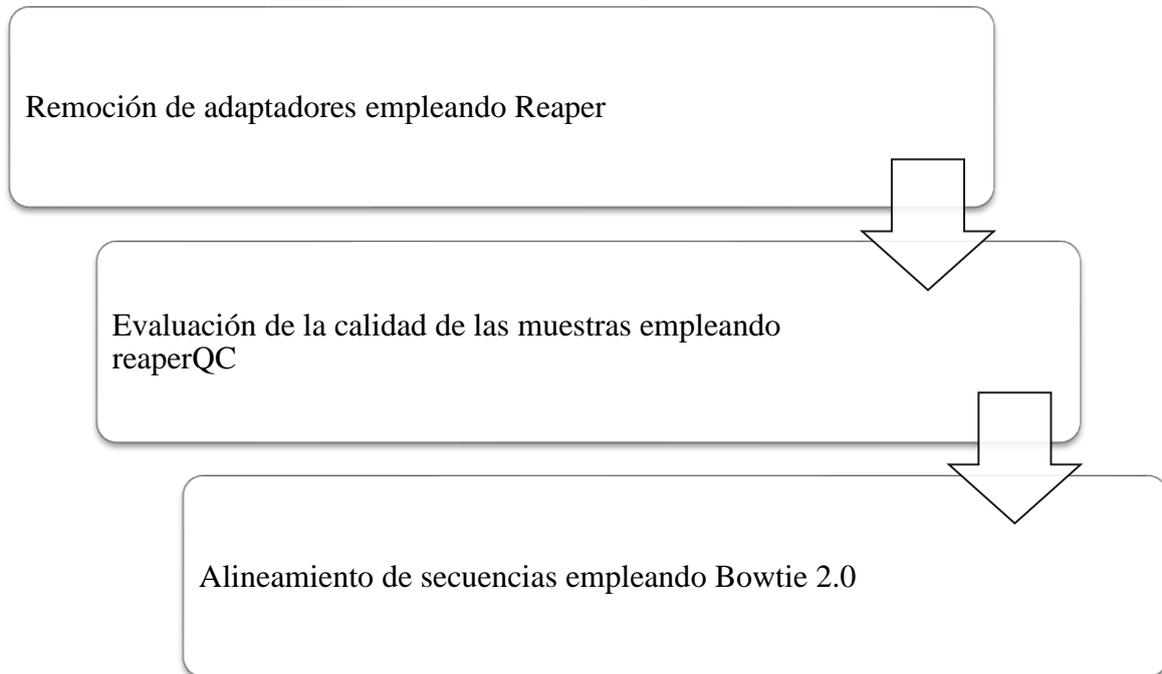


Figura 3 Flujo de pasos del análisis bioinformático de la data proveniente del sRNA-Seq

La remoción del adaptador del extremo 3' se realizó empleando la herramienta Reaper (107) en R Studio. Luego de la remoción de adaptadores, la calidad de las muestras fue evaluada empleando la herramienta reaperQC (107). El puntaje de calidad ("Phred score") fue representado por un código ASCII igual a su valor más 33.

Posteriormente, el alineamiento de las secuencias se realizó empleando la herramienta Bowtie 2.0 (v 2.5.1) tomando como referencia a los microRNAs maduros anexados a la base de datos miRBase (v22.1).

4.10. SELECCIÓN DE MICRORNAS DE REFERENCIA

A fin de identificar los microRNAs de referencia para los ensayos de RT-qPCR, se realizaron 3 pasos de filtrado iniciales sobre los datos obtenidos de la secuenciación, en base a lo propuesto por Sampathkumar *et al.* (108).

El primer paso se basó en la selección de todos los microRNAs con un valor de p ajustado superior a 0.05. Luego, se eliminaron los microRNAs con valores de \log_2 Fold Change (\log_2 FC) inferiores a -0.1 y superiores a 0.1. Finalmente, se descartaron los microRNAs con un promedio de lecturas inferior a 500 a fin de garantizar una cantidad suficiente de secuencias para la detección mediante RT-qPCR.

Los 57 microRNAs obtenidos después de los pasos de filtración se ingresaron en el software en línea RefFinder para identificar los candidatos más estables (109). Paralelamente, se realizó una búsqueda bibliográfica para identificar microRNAs previamente asociados con el desarrollo de cáncer, con el fin de no considerarlos como potenciales candidatos. Los candidatos más estables que no se habían asociado previamente con el desarrollo de cáncer fueron miR-6749-5p, miR-12121 y miR-6722-3p.

Estos 3 microRNAs y 2 adicionales sugeridos por un estudio previo como candidatos robustos para el análisis de microRNAs en saliva (miR-16-5p y miR-25) fueron amplificados mediante RT-qPCR (110). Los datos del qPCR fueron utilizados para realizar

un nuevo análisis de estabilidad utilizando geNorm a fin de determinar los microRNAs más estables. El programa geNorm calcula la medida de estabilidad de la expresión genética (Valor-M) como la variación por pares con todos los demás genes de control insertados en el programa, calculando la desviación estándar de los valores de expresión (111). La exclusión gradual del gen con el valor-M más alto da como resultado una combinación de dos genes que tienen la expresión más estable en las muestras analizadas.

La media geométrica de estos microRNAs fue empleada para calcular la variación de expresión (fold change).

4.11. SÍNTESIS DE cDNA Y qPCR

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 2 µl de RNA empleando el kit TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems™, Waltham, MA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA obtenido fue almacenado a -20°C hasta su análisis.

El qPCR se llevó a cabo en un plazo máximo de 2 semanas después de la obtención del cDNA, empleando los ensayos pre-diseñados TaqMan™ Advanced miRNA Assays (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Cada muestra fue analizada por triplicado, bajo las siguientes condiciones de ciclaje: 20 segundos a 95 °C y 40 ciclos de 1 segundo a 95 °C y 20 segundos a 60 °C. La amplificación se realizó empleando el termociclador LightCycler® 480 (Roche, Mannheim, Alemania).

Los resultados obtenidos del qPCR fueron transferidos al software GenEx™ (MultiD Analyse AB, Gotemburgo, Suecia) para realizar el cálculo del promedio de réplicas, la

calibración entre placas y el análisis de microRNAs de referencia con geNorm. Se consideró un mínimo de 2 réplicas por muestra con una desviación estándar ≤ 0.2 .

La expresión relativa de los microRNAs de interés frente a los microRNAs de referencia fue realizado empleando el método de $2^{-\Delta Cq}$, mientras que el cambio en la expresión (fold change) de los microRNAs de interés fue calculado mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (112).

4.12. ANÁLISIS DE DATOS

Inicialmente, la información registrada en la ficha de recolección de datos fue ingresada a una hoja de cálculo de Excel, a fin de crear una base de datos exclusiva para el proyecto.

Para las variables continuas recolectadas se reportaron medias y desviaciones estándar o medianas y rangos intercuartílicos (RIC), según la normalidad de los datos; mientras que, para las variables categóricas se emplearon frecuencias y porcentajes.

Previo a la realización del análisis de expresión diferencial, la distribución de la data obtenida del secuenciación fue explorada mediante la construcción de gráficos de cajas y bigotes y gráficos de densidad para el conteo de lecturas. Luego, se corrió el modelo DESeq2 (v 1.40.2), empleado para normalizar la data con respecto a la profundidad del secuenciación y la composición de RNA (113). Inicialmente, el modelo calcula los factores de normalización ('size factors'), para luego estimar la dispersión para cada gen. Luego, se ajusta una curva a las estimaciones de dispersión, y se aplica un método para reducir estas estimaciones hacia los valores predichos por la curva ('shrinkage method'). El resultado del modelo es visualizado mediante gráficos de dispersión en el que se observan los valores de dispersión frente al promedio de lecturas, así como la curva ajustada y las estimaciones

reducidas. Posterior a la normalización, se verificó la distribución de la data empleando nuevamente los gráficos de cajas y bigotes y gráficos de densidad para el conteo de lecturas.

A fin de evaluar la similitud y agrupamiento de las muestras, se realizó un análisis de correlación de Pearson y un análisis de componentes principales (PCA). Previo a la aplicación de estos métodos, se aplicó una transformación de estabilización de la varianza (VST). El resultado del análisis de correlación fue representado mediante un mapa de calor; mientras que el resultado del PCA mediante gráficos de PCA para el primer y segundo componente.

El análisis de expresión diferencial (DEA) entre el grupo de pacientes con una EMR ≥ 10 % (grupo de referencia) y el grupo de pacientes con una EMR $< 10\%$ (grupo control) se llevó a cabo utilizando el paquete DESeq2 (v 1.40.2) en R Studio. Se consideró que un microRNA se encontraba diferencialmente expresado cuando el valor p ajustado estaba por debajo de 0.01 y el \log_2 FC por encima de 1, valor que indica una duplicación en la expresión de la secuencia. Antes de llevar a cabo el DEA, se eliminaron los microRNAs que presentaron conteos de lecturas mayores a 10 en más de 6 muestras.

El valor de \log_2 FC y el valor de p ajustado para los microRNAs identificados mediante el secuenciación fueron visualizados mediante un 'volcano plot'. Asimismo, se construyó un mapa de calor para visualizar los microRNAs con un valor p ajustado menor a 0.01 y un \log_2 FC de 4. Adicionalmente, el conteo de lecturas de los 3 microRNAs que exhibieron los niveles de sobreexpresión y subexpresión más altos fue graficado empleando gráficos de puntos. Se estableció un punto de corte para el FC igual a 1.5 para considerar un nivel de expresión con un impacto significativo en la biología de la célula (114).

Las diferencias en la expresión relativa de los microRNAs, medida mediante la técnica de RT-qPCR, fueron evaluadas mediante la prueba de Mann-Whitney.

La utilidad de los microRNAs como biomarcadores de EMR en el día 15 de la quimioterapia fue determinada mediante el cálculo del AUC ROC, tomando como gold estándar a la citometría de flujo. Inicialmente, se estableció un modelo de regresión logística univariado tomando como variable predictora el cociente entre el Cq del microRNA de interés y la media geométrica del Cq de los microRNAs de referencia. Luego, se estableció un modelo multivariado tomando como variable predictora a la probabilidad predicha en base a los coeficientes de regresión para cada variable individual (cociente entre el Cq de cada microRNA de interés y la media geométrica del Cq de los microRNAs de referencia). En ambos modelos, se consideró como variable respuesta al grupo de riesgo determinado en base al resultado de la citometría de flujo en el día 15 de la quimioterapia (riesgo alto: EMR $\geq 10\%$, riesgo estándar-intermedio: EMR $< 10\%$). El resultado de la predicción obtenido mediante la regresión univariada y multivariada se utilizó para la construcción de curvas ROC y determinación del AUC ROC. Se evaluó si existían diferencias estadísticamente significativas entre los AUC ROCs calculados mediante la prueba de DeLong.

Finalmente, a fin de determinar un valor del cociente entre el Cq del microRNA de interés y la media geométrica del Cq de los microRNAs de referencia que permita diferenciar entre pacientes del grupo de riesgo alto y el grupo de riesgo estándar-intermedio en la práctica clínica, se calculó el punto de corte óptimo que maximiza la sensibilidad y especificidad, utilizando el índice de Youden.

Se consideró un nivel de significancia de 0.05 para todos los análisis realizados.

4.13. ASPECTOS ÉTICOS

Se cumplieron con los principios éticos universales propuestos en la Declaración de Helsinki para el desarrollo de estudios que involucran la participación de seres humanos.

Se tomaron todas las medidas para prevenir que los sujetos de investigación o sus padres se sintiesen coaccionados a brindar su aprobación para participar en el estudio, enfatizando que su participación era voluntaria y que podrían revocar su asentimiento o consentimiento en cualquier momento, sin necesidad de brindar explicaciones y sin que el tratamiento médico que recibía el paciente o la relación con el equipo médico que lo atendía se viera afectada.

Por otro lado, a fin de evitar la discriminación de individuos durante el enrolamiento, este proceso fue realizado en base al orden en el que los pacientes ingresaban al Servicio de Hematología para ser atendidos, y teniendo como único criterio de selección que el médico tratante haya solicitado un frotis de médula ósea y/o sangre periférica y una prueba de citometría de flujo, mas no características sociodemográficas como el estrato socioeconómico, raza, religión, etc.

El anonimato de los participantes del estudio fue resguardado mediante la asignación de un único código numérico a cada paciente, en base al orden en el que fueron enrolados. Este código fue empleado para diferenciar entre fichas de recolección de datos y muestras biológicas pertenecientes a diferentes individuos. Asimismo, dicho código fue utilizado para identificar a cada paciente al momento de ingresar los datos recolectados en la ficha, a la base de datos del proyecto.

La confidencialidad fue asegurada mediante la restricción del acceso a la base de datos del proyecto empleando una contraseña que era conocida únicamente por el investigador principal (IP) y el almacenamiento de los consentimientos informados y las fichas de recolección de datos físicas en un gabinete de la SUIIT, bajo llave, a la que sólo tenía acceso el IP.

El proyecto contó con la autorización del Comité de Ética de la UPCH y del Comité Institucional de Ética en Investigación del INSN-SB para su ejecución. La aprobación fue suscrita el 06 de abril y 02 de junio del 2022, bajo la constancia N° 021-2022 y N° 140-14-22, respectivamente.

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

El flujo para la selección de los pacientes incluidos en el estudio se muestra en la figura 4. Se enrolaron un total de 124 pacientes, de los cuales 3 fueron excluidos por encontrarse en la Unidad de Cuidados Intensivos el día programado para la recolección de la muestra de saliva y orina.

Durante la fase exploratoria utilizando sRNA-Seq, se incluyeron 6 pacientes de cada grupo de riesgo ($n = 12$). Del total restante de pacientes ($n = 94$), 34 pertenecieron al grupo de riesgo alto y sólo 23 tuvieron disponible al menos una muestra de saliva para el aislamiento de ARN, debido a limitaciones en la recolección de este tipo de muestra en infantes (< 7 años).

Se incluyeron 26 pacientes de cada grupo de riesgo en la fase de validación mediante RT-qPCR. Tres de estos 26 pares se incluyeron previamente durante la fase exploratoria y 23 se eligieron en función de la coincidencia de edad y sexo entre los grupos de riesgo alto e intermedio estándar.

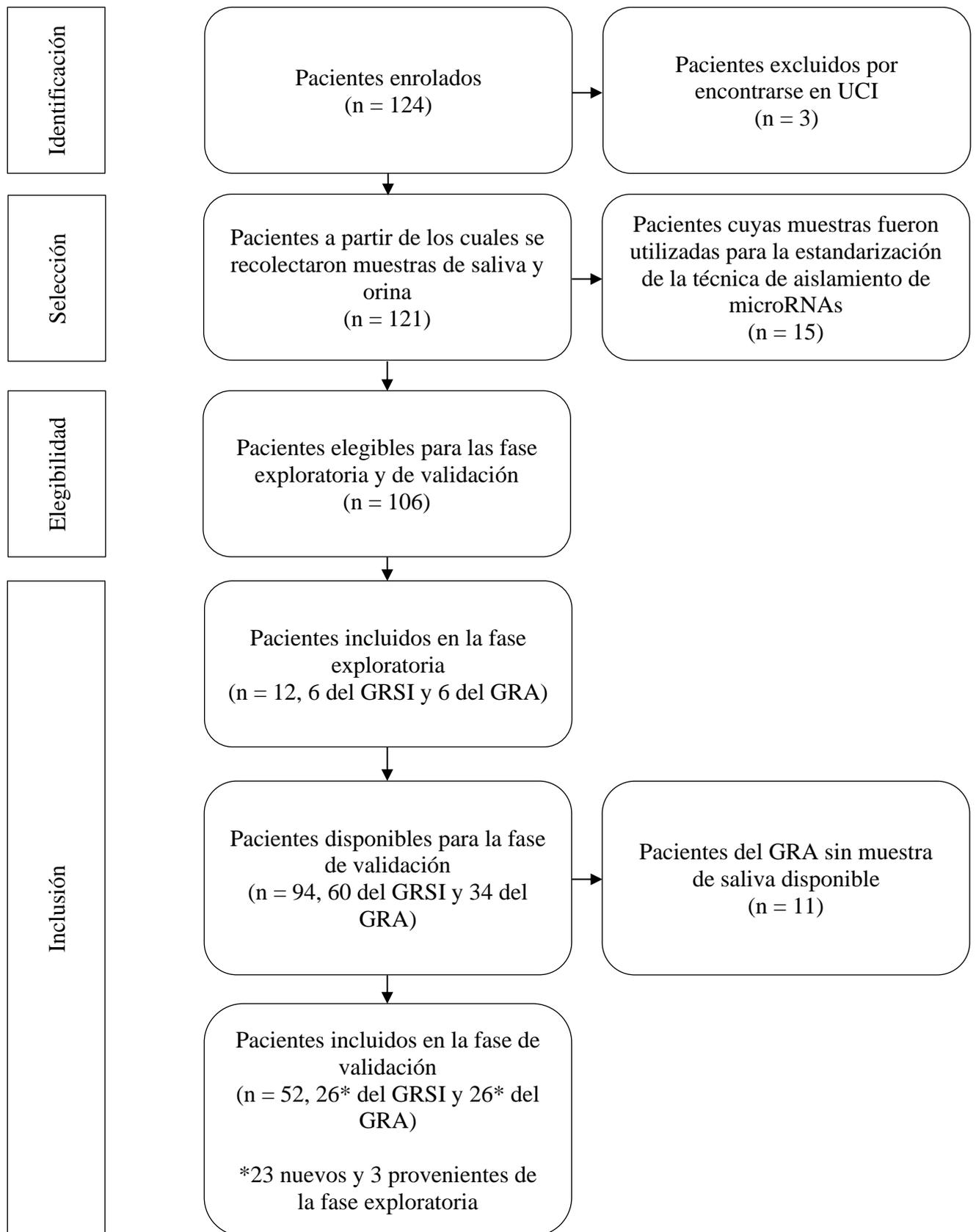


Figura 4. Flujo para la selección de los pacientes incluidos en el estudio

GRA: Grupo de riesgo alto, GRSI: grupo de riesgo estándar-intermedio.

Debido a que no se observó amplificación de control de extracción (cel-miR-39) en 3 muestras del grupo de riesgo alto, éstas fueron retiradas del análisis, quedando un total de 23 muestras en este grupo y 26 en el grupo de riesgo estándar-intermedio. Las principales características sociodemográficas, clínicas y hematológicas de los pacientes incluidos en cada fase del estudio se resumen en la Tabla 5.

La mayoría de los pacientes incluidos en el estudio nacieron en la capital del Perú, Lima. La mediana de edad al diagnóstico fue de 7.67 y 8.01 años en el grupo de pacientes incluidos en la fase exploratoria y la fase de validación, respectivamente. La proporción hombre:mujer en el grupo de la segunda fase 3.08:1.

El análisis citogenético reveló la presencia de cariotipos complejos en el 16.67% de los pacientes incluidos en la fase exploratoria y en el 16.33% de los pacientes incluidos en la fase de validación. La mayoría de los pacientes incluidos en ambas fases no presentaron los genes de fusión analizados de forma rutinaria en el INSN-SB. El inmunofenotipo predominante de LLA fue el inmunofenotipo B. La mediana de EMR en los grupos de riesgo alto y riesgo intermedio estándar fue de 54.68% y 1.26%, respectivamente, en los pacientes incluidos en la fase exploratoria, y de 26.90% y 1.27%, en los pacientes incluidos en la fase de validación.

Tabla 5. Características sociodemográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio

	Fase exploratoria (n = 12)	Fase de validación (n = 49)
Variable	n (%)	
Sexo		
Femenino	6 (50)	12 (24.49)
Masculino	6 (50)	37 (75.51)
Lugar de procedencia		
Lima	8 (66.67)	27 (55.10)
Provincia	4 (33.33)	22 (44.90)
Aberración cromosómica		
Aberraciones estructurales y numéricas	1 (8.33)	6 (12.24)
t(2;19)(p13;p13)	1 (8.33)	1 (2.04)
+5	0 (0)	1 (2.04)
del(6)(q13q23)	0 (0)	1 (2.04)
inv(9)(p12q13)	0 (0)	1 (2.04)
add(11)(q13)[17]	0 (0)	1 (2.04)
t(9;22)(q34;q11.2)	0 (0)	1 (2.04)
Cariotipo complejo (≥ 3 aberraciones cromosómicas simultáneas)	2 (16.67)	8 (16.33)
Cariotipo normal	4 (33.33)	20 (43.48)
Resultado no disponible	5 (41.67)	15 (30.61)
Gen de fusión		

BCR-ABL p190	0 (0)	1 (2.04)
BCR-ABL p210	0 (0)	1 (2.04)
TEL-AML1	1 (8.33)	4 (8.16)
E2A-PBX1 (TCF3-PBX1)	0 (0)	4 (8.16)
MLL-AF	0 (0)	0 (0)
Ninguno de los anteriores	10 (83.33)	39 (79.59)
Resultado no disponible	1 (8.33)	0 (0)
Inmunofenotipo de LLA		
LLA tipo B	100 (100)	43 (87.76)
LLA tipo T	0 (0)	6 (12.24)
Respuesta a prednisona		
Positiva (< 1000 blastos/ μ l)	9 (75)	36 (73.47)
Negativa (\geq 1000 blastos/ μ l)	3 (25)	12 (24.49)
Resultado no disponible	0 (0)	1 (2.04)
	Mediana (RIC)	
Edad (años)	7.67 (6.99)	8.01 (5.48)
Porcentaje de blastos en médula ósea (%)	76.04 (24.63)	79 (28.46)
Conteo de leucocitos (10^3 cel/ μ l)	23.84 (63.86)	28.90 (98.83)
Conteo de neutrófilos (10^3 cel/ μ l)	2.13 (5.11)	1.48 (4.33)
Conteo de plaquetas (10^3 cel/ μ l)	77.50 (64)	48 (66)
Hemoglobina (g/dl)	7.75 (3.93)	8.40 (4.20)
EMR (%)		
Grupo de riesgo alto (EMR \geq 10%)	54.68 (60.07)	26.90 (37.47)
	1.26 (2.70)	1.27 (3.64)

Grupo de riesgo estándar-intermedio (EMR < 10%)		
--	--	--

5.2. IDENTIFICACIÓN DE MICRORNAS EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE MEDIANTE sRNA-SEQ

5.2.1. ANÁLISIS DE sRNA-SEQ EN SALIVA

Evaluación de la calidad de las muestras secuenciadas

Todas las muestras de saliva analizadas pasaron la evaluación de calidad. El valor del cuantil 90 para el código ASCII fue de 70 para todas las muestras. Este valor corresponde a un puntaje de calidad (“Phred score”) de 37, equivalente a menos de 1 error en 1000 pares de bases. Asimismo, se observaron picos notorios en el conteo de lecturas en la región alrededor de lecturas de una longitud de 22-25 nucleótidos, correspondientes a los microRNAs, en todas las muestras.

Exploración del conteo de lecturas en saliva previo a la normalización

Las muestras provenientes de pacientes con un riesgo estándar-intermedio de recaída fueron agrupadas bajo la denominación “SR”, mientras que las muestras provenientes de pacientes con un riesgo alto, bajo la denominación “HR”.

La mediana y el valor máximo del conteo de lecturas no normalizadas para cada muestra se describe en la tabla 6, mientras que la distribución gráfica del conteo de lecturas se muestra en la figura 5. Se observó una tendencia hacia conteos de lectura más altos en el grupo de muestras 4, 5 y 6, independientemente del grupo de riesgo.

Tabla 6. Mediana y valor máximo del conteo de lecturas crudas para las muestras de saliva

Muestra	Mediana	Valor máximo	Muestra	Mediana	Valor máximo
SR1	60	176,628	HR1	25	397,139
SR2	101	53,559	HR2	13	32,755
SR3	48	225,699	HR3	16	52,990
SR4	123	44,107	HR4	258	141,934
SR5	212	96,123	HR5	298	169,925
SR6	67	11,741	HR6	88	55,907

SR: riesgo estándar-intermedio, HR: riesgo alto.

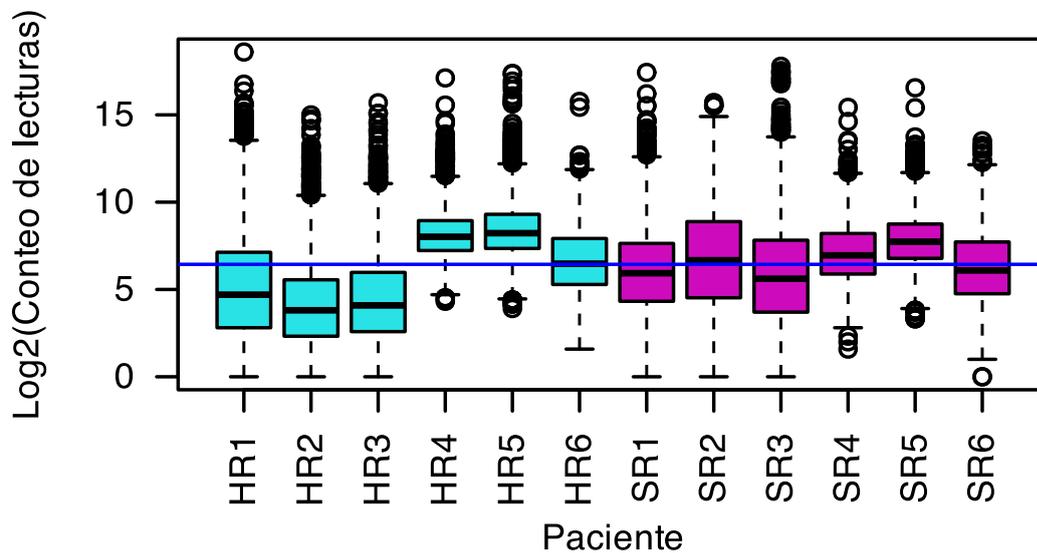


Figura 5. Distribución del conteo de lecturas no normalizadas en saliva

Línea azul: mediana del conteo de lecturas. SR: riesgo estándar-intermedio, HR: riesgo alto.

La tendencia se confirmó en el gráfico de densidad de recuento de lecturas, donde se observó que las muestras HR4, HR5, HR6, SR4, SR5 y SR6 se desplazaron más hacia la derecha en comparación con el resto de las muestras, lo que sugiere una mayor densidad de recuentos de lectura más altos (figura 6).

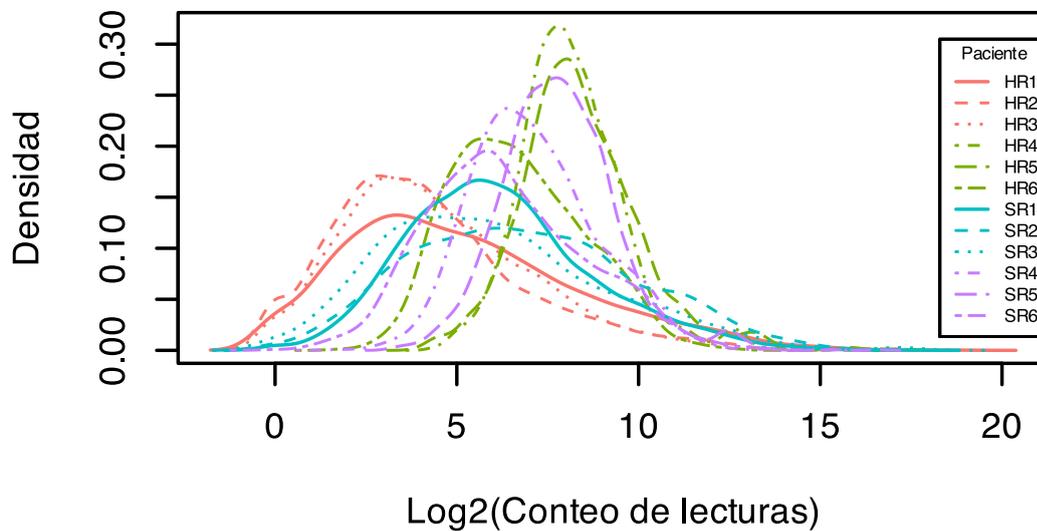


Figura 6. Densidad del conteo de lecturas no normalizadas en saliva

SR: riesgo estándar-intermedio, HR: riesgo alto.

Exploración del conteo de lecturas en saliva posterior a la normalización

La mediana y el valor máximo del conteo de lecturas normalizadas para cada muestra se describe en la tabla 7, mientras que la distribución gráfica del conteo de lecturas se muestra en la figura 7. Como se esperaba después de aplicar la normalización, las medianas de las muestras se volvieron homogéneas.

Tabla 7. Mediana y valor máximo del conteo de lecturas normalizadas para las muestras de saliva

Muestra	Mediana	Valor máximo	Muestra	Mediana	Valor máximo
SR1	74.80	209,709.43	HR1	66.9	983,516.4
SR2	69.56	34,177.89	HR2	72.50	169,627.22
SR3	70.56	306,242.62	HR3	68.39	213,179.55
SR4	78.235	26,958.767	HR4	87.08	46,640.83
SR5	92.90	40,404.36	HR5	88.27	49,016.20
SR6	76.52	13,020.35	HR6	81.82	49,184.73

SR: riesgo estándar-intermedio, HR: riesgo alto.

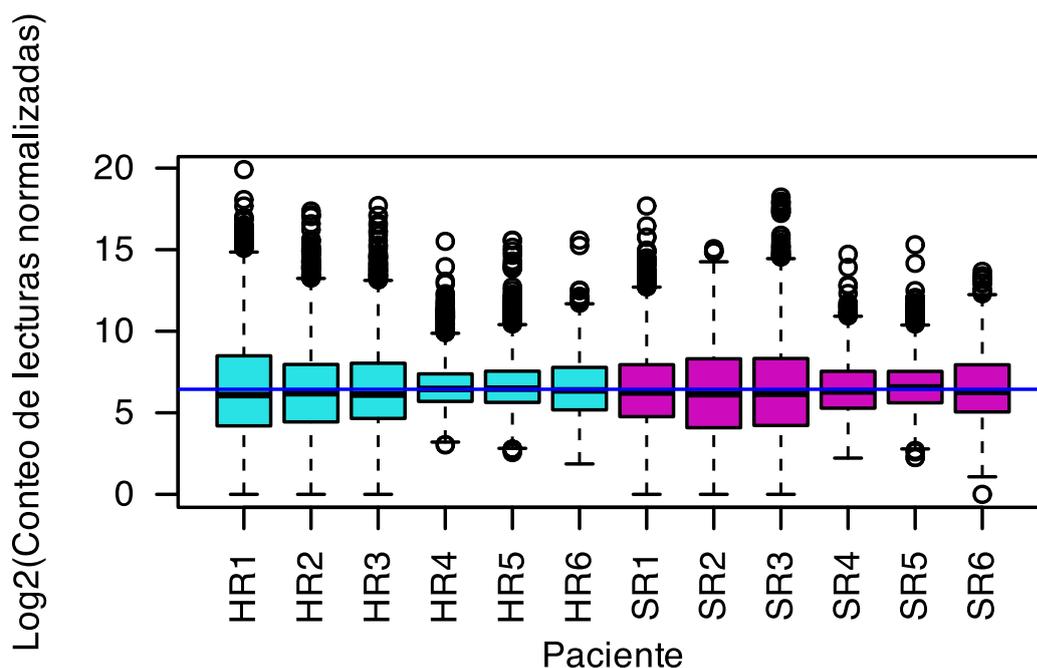


Figura 7. Distribución del conteo de lecturas normalizadas en saliva

Línea azul: mediana del conteo de lecturas. SR: riesgo estándar-intermedio, HR: riesgo alto.

De forma similar, en el gráfico de densidad se observó que todas las curvas presentaron la misma tendencia hacia un mayor número de lecturas entre un \log_2 de 5 (32 lecturas) y un \log_2 de 10 (1024 lecturas), aunque las muestras HR4, HR5 y SR5 exhibieron un pico más pronunciado en esta área, lo que indica que mostraron una mayor densidad de microRNAs con conteos de lectura alrededor de estos números (figura 8).

Los conteos de lectura iguales a 1 (pico en un \log_2 de 0) en las muestra HR1, HR2 y HR3 se mantuvieron después de la normalización. Las lecturas normalizadas se utilizaron para realizar el posterior DEA.

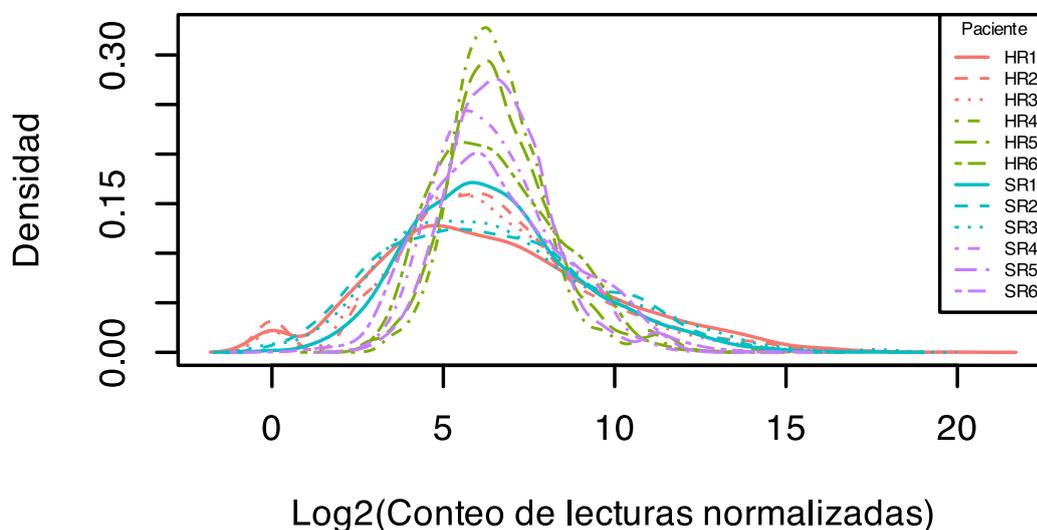


Figura 8. Densidad del conteo de lecturas normalizadas en saliva

SR: riesgo estándar-intermedio, HR: riesgo alto.

Agrupamiento y correlación de muestras de saliva

No se observó un patrón de agrupamiento de las muestras de acuerdo al grupo de riesgo de recaída (figura 9). Este hallazgo sugirió la presencia de un factor biológico adicional en el grupo de riesgo de recaída, que estaría dirigiendo el cambio en el perfil de expresión de los microRNAs en las muestras. Para explorar la posible influencia de un factor biológico adicional en el agrupamiento de muestras, se realizaron análisis de PCA considerando como factores el sexo, la edad, el perfil citogenético, el perfil molecular y la respuesta a la prednisona del paciente. Además, se incluyó el lote de secuenciación como factor a evaluar. Aunque no se observó ningún patrón notable de agrupamiento de las muestras bajo ninguno de los factores biológicos evaluados (figuras 31-35 del Anexo 6), sí fue evidente un patrón de agrupamiento según el lote de secuenciación (figura 10).

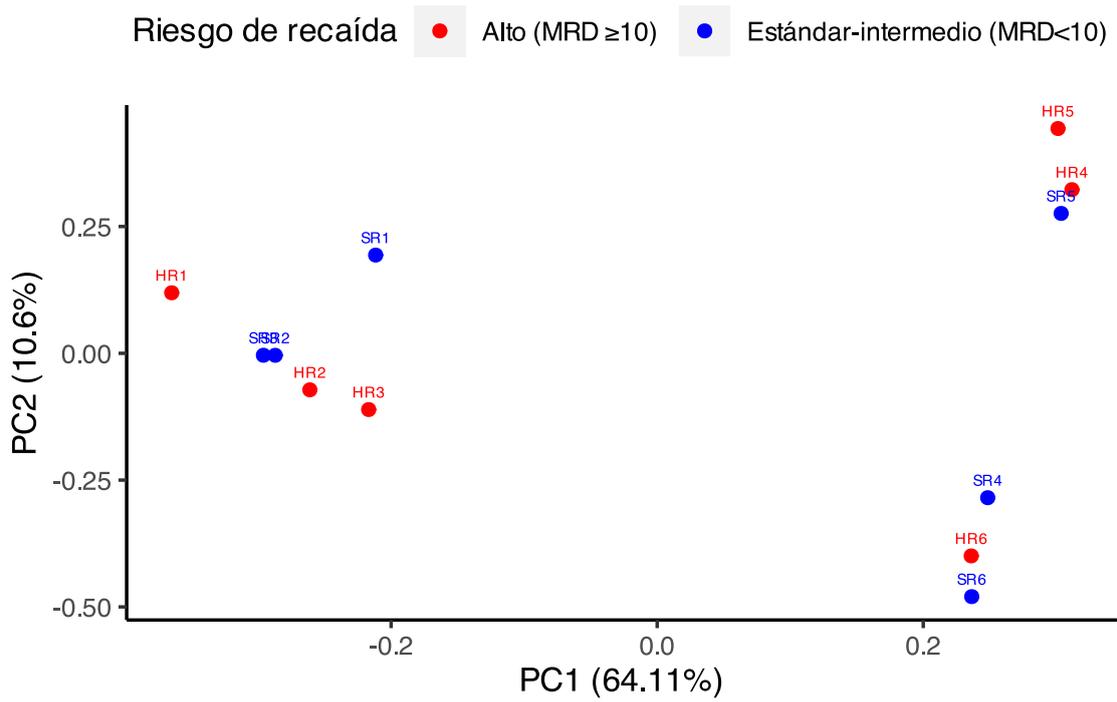


Figura 9. PCA según grupo de riesgo de recaída, en saliva

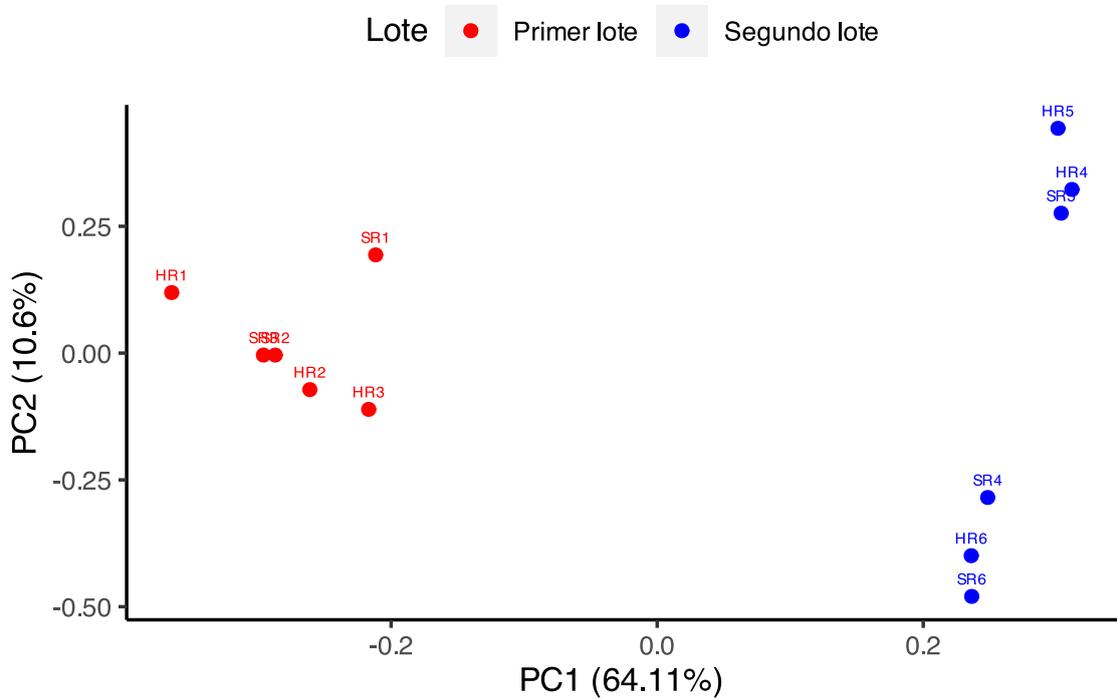


Figura 10. PCA según lote de secuenciación, en saliva

El análisis de correlación mostró que la correlación entre las muestras SR2 y SR3 fue la más alta ($r = 0.93$) entre todos los pares analizados, seguida de los pares SR3 y SR1 ($r = 0.92$), SR2 y SR1, HR1 y SR1, SR4 y SR6, HR4 y SR5 ($r = 0.91$), SR3 y HR1, HR6 y SR4, y HR4 y HR5 ($r = 0.90$) (figura 11). Asimismo, se observó una separación de las muestras en 2 clusters principales en función del lote de secuenciación e independientemente del grupo de riesgo de recaída (figuras 9 y 10). Debido a que el lote de secuenciación demostró influir en los resultados de la expresión de los microRNAs, se decidió incluir este factor en el DEA utilizando DeSeq2.

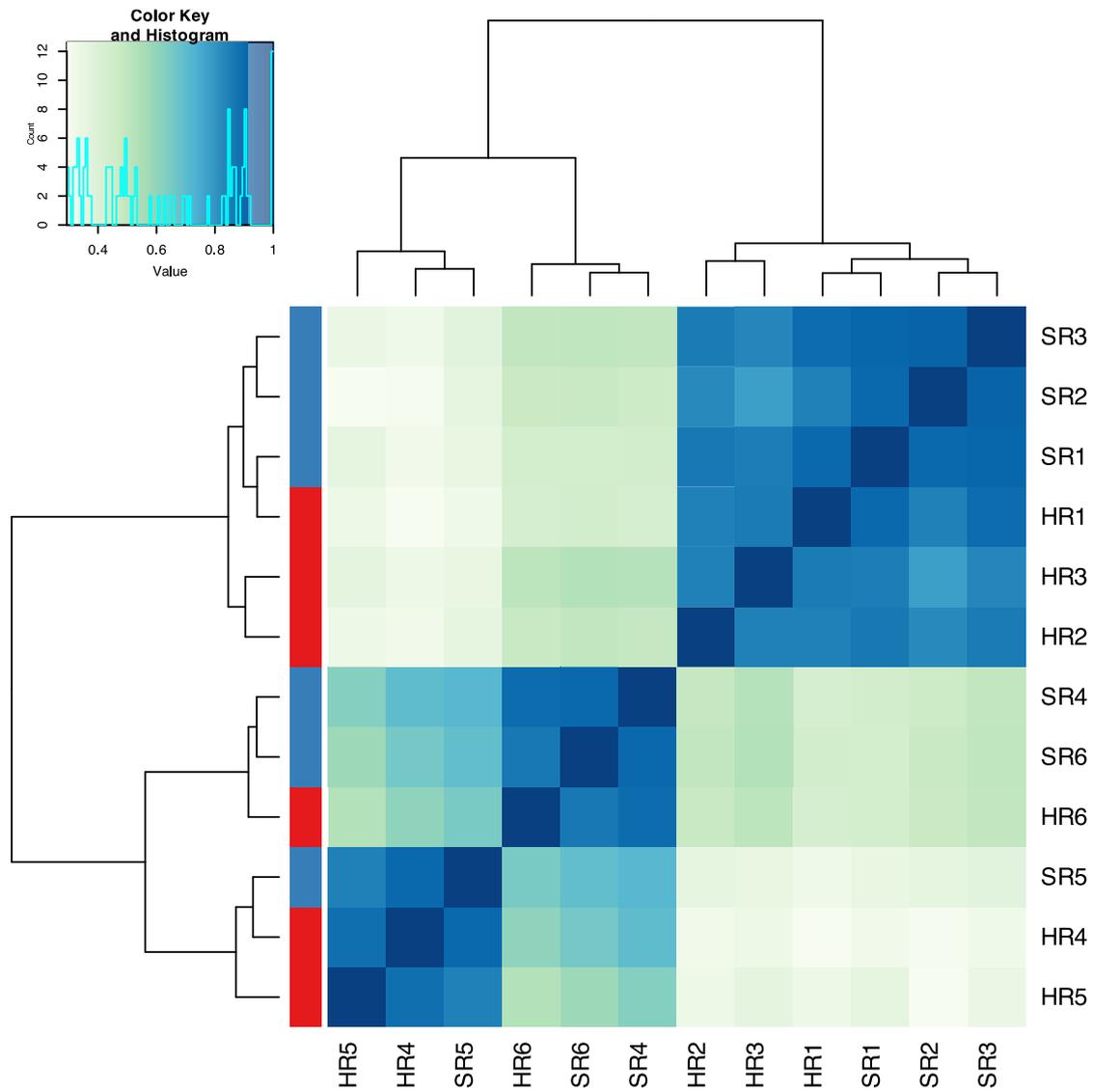


Figura 11. Mapa de calor basado en la correlación entre muestras de saliva

En la esquina superior izquierda se muestra un histograma de los valores utilizados para construir el mapa de calor junto con la gama de colores correspondiente a cada valor. Por otro lado, el dendograma que sobresale del mapa indica la distancia en cuanto al patrón de expresión de microRNAs entre muestras. La intensidad del color en el mapa de calor está directamente relacionada con el nivel de correlación entre las muestras. Los niveles más altos están representados por colores más oscuros, mientras que los niveles inferiores están representados por colores más claros.

Análisis de expresión diferencial en saliva

Se logró identificar 30 microRNAs expresados diferencialmente entre el grupo de riesgo alto y el grupo de riesgo estándar-intermedio en saliva (p ajustado $< 0,05$). Los microRNAs cuyos nombres se muestran en el ‘volcano plot’ (figura 12) corresponden a las secuencias con los valores de \log_2 FC más altos.

Los microRNAs, miR-1246, 223-3p y miR-1290 presentaron el mayor grado de sobreexpresión con significancia biológica ($FC > 1.5$) en el grupo de riesgo alto en comparación con el grupo estándar-intermedio (tabla 8). Por el contrario, miR-3650, miR-4740-3p y miR-4713-3p tuvieron los niveles más altos de subexpresión en el grupo de riesgo alto en comparación con el grupo de alto estándar intermedio (tabla 8).

Riesgo alto vs riesgo estándar-intermedio

EnhancedVolcano

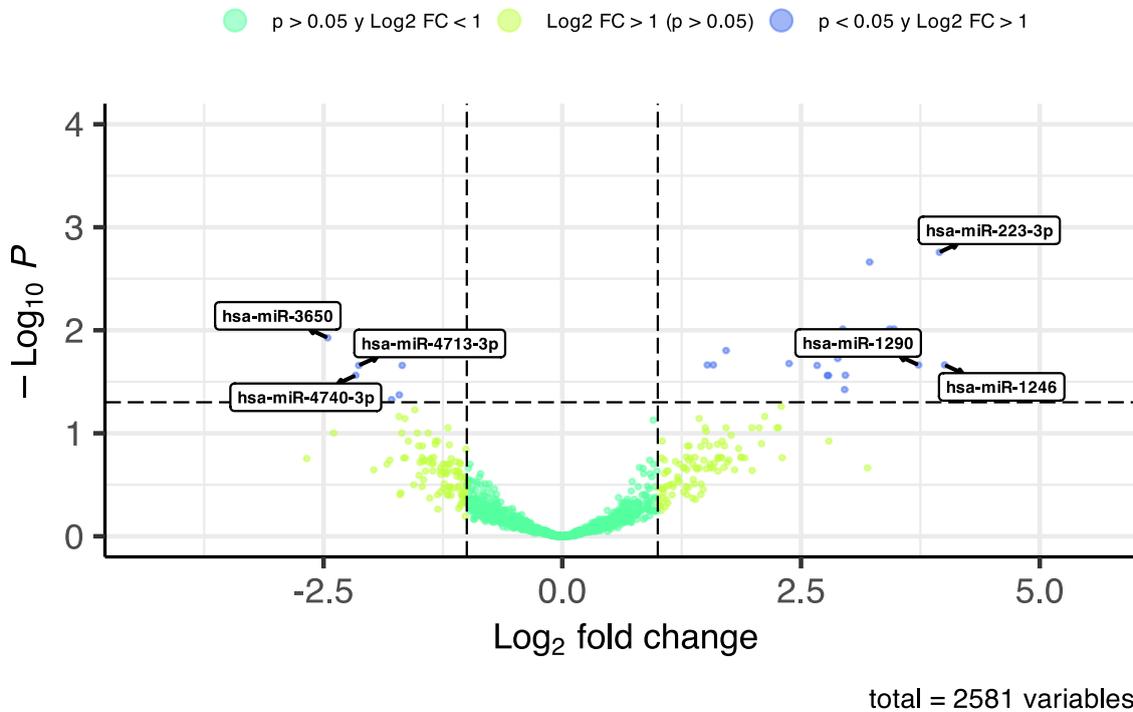


Figura 12. Volcano plot con los resultados del DEA en saliva

Un valor de $\text{log}_2 \text{FC}$ igual a 1 se interpreta como un incremento o una reducción del 50% en la expresión de un determinado microRNA en el grupo de riesgo alto en comparación con el grupo de riesgo estándar-intermedio.

Tabla 8. Promedio de lecturas, log₂ FC y valor de p para los 30 microRNAs expresados diferencialmente en saliva

microRNA	Promedio de lecturas	Log ₂ FC	p-ajustado	microRNA	Promedio de lecturas	Log ₂ FC	p-ajustado
miR-3650	142.04	-2.46	0.012	let-7i-5p	2197.45	2.78	0.027
miR-4740-3p	1607.00	-2.16	0.027	miR-26 ^a -5p	4528.74	2.79	0.027
miR-4713-3p	422.46	-2.13	0.022	miR-423-5p	4924.59	2.81	0.015
miR-6778-5p	609.84	-2.02	0.016	miR-375-3p	5629.12	2.88	0.019
miR-503-5p	2158.64	-2.00	0.016	miR-143-3p	366.56	2.94	0.010
miR-4515	1017.73	-1.79	0.047	let-7b-5p	15309.27	2.96	0.038
miR-6720-3p	253.71	-1.71	0.042	miR-183-5p	3376.58	2.96	0.027
miR-6817-5p	169.30	-1.68	0.022	let-7 ^a -5p	16815.26	3.16	0.012
miR-3065-5p	85.82	1.52	0.022	let-7f-5p	6506.01	3.19	0.012
miR-6759-5p	136.55	1.58	0.022	miR-142-3p	645.15	3.22	0.002
miR-30e-3p	170.99	1.72	0.016	let-7g-5p	2253.09	3.43	0.010
miR-200c-3p	5004.97	2.37	0.021	let-7c-5p	9101.65	3.47	0.010

miR-26b-5p	399.53	2.55	0.012	miR-1290	14553.72	3.73	0.022
miR-191-5p	4033.80	2.67	0.022	miR-223-3p	11637.50	3.95	0.002
let-7d-5p	392.84	2.70	0.014	miR-1246	20560.43	4.00	0.022

El mapa de calor de los microRNAs expresados diferencialmente mostró que miR-1246 y miR-1290 se agruparon en el mismo cluster según el dendograma; mientras que, miR-223-3p estuvo ubicado en un grupo distante al del miR-1246 y miR-1290 (figura 13).

Dos de los 3 microRNAs que presentaron los mayores grados de subexpresión (miR-4740-3p y miR-4713-3p) se agruparon en el mismo cluster junto con miR-503-5p, miR-4515 y miR 6778-5p. miR-4713-3p estuvo más cerca del miR 6778-5p; mientras que miR-4740-3p, del miR-4515 y miR-503-5p. miR-3650 se ubicó en un grupo alejado de los otros microRNAs que presentaron el mayor grado de subexpresión.

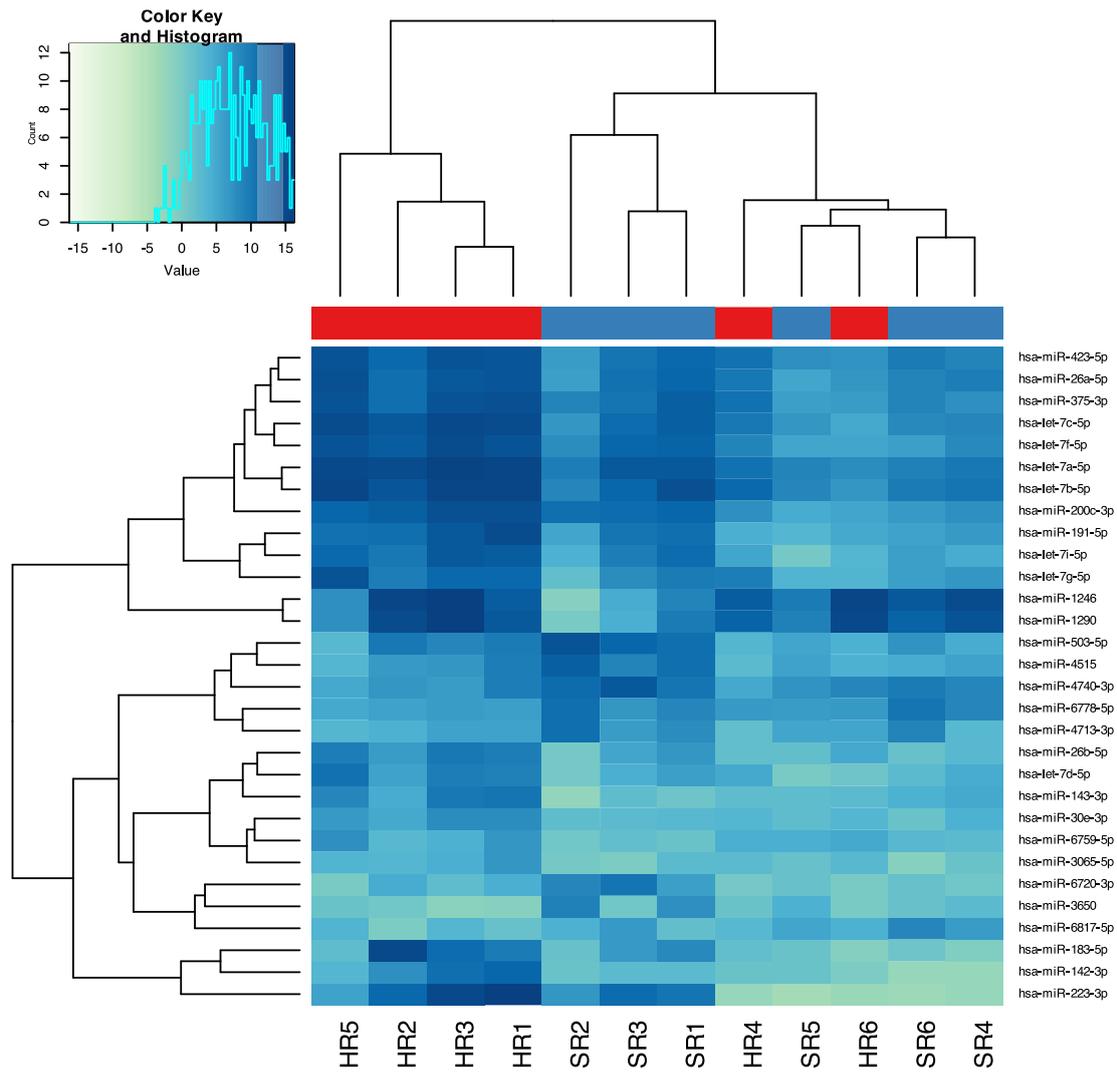


Figura 13. Mapa de calor para los 30 microRNAs expresados diferencialmente en saliva

En la esquina superior izquierda se muestra un histograma de los valores utilizados para construir el mapa de calor junto con el rango de color correspondiente a cada valor. Por otro lado, el dendrograma horizontal que sobresale del mapa indica la distancia en cuanto al patrón de expresión de microRNAs entre muestras; mientras que el dendrograma vertical, la distancia en cuanto al patrón de expresión entre los microRNAs expresados diferencialmente. La intensidad del color en el mapa de calor está directamente relacionada con el nivel de expresión de los microRNAs. Los niveles más altos están representados por colores más oscuros, mientras que los niveles inferiores están representados por colores más claros.

El mapa de calor demostró además que la sobreexpresión y subexpresión de los microRNAs expresados diferencialmente no fue común a todas las muestras del mismo grupo de riesgo, lo que sugirió que la obtención de valores de \log_2 FC significativos para los microRNAs con los mayores grados de desregulación pudo deberse a valores atípicos en los datos. Por esta razón, se construyeron gráficos de puntos para el conteo de lecturas normalizadas (figuras 14 y 15).

Los recuentos de lecturas normalizados de al menos el 50% de las muestras en el grupo de riesgo alto fueron notablemente más altos que los recuentos de lecturas de las muestras en el grupo de riesgo intermedio-estándar para los 3 microRNAs con los grados más altos de sobreexpresión (figura 14), lo que sugiere que las diferencias encontradas son reales y no se deben a valores atípicos en los datos.

Esta diferencia notable entre los grupos de riesgo no se observó para los microRNAs con los grados más altos de subexpresión (figura 15). Además, se observó la presencia de un valor atípico en los datos del miR-4740-3p, correspondiente al conteo de lecturas de la muestra SR3.

Basado en los resultados obtenidos en el DEA, se decidió validar la expresión del miR-1246, miR-1290 y miR-223-3p en saliva en las siguientes fases del estudio.

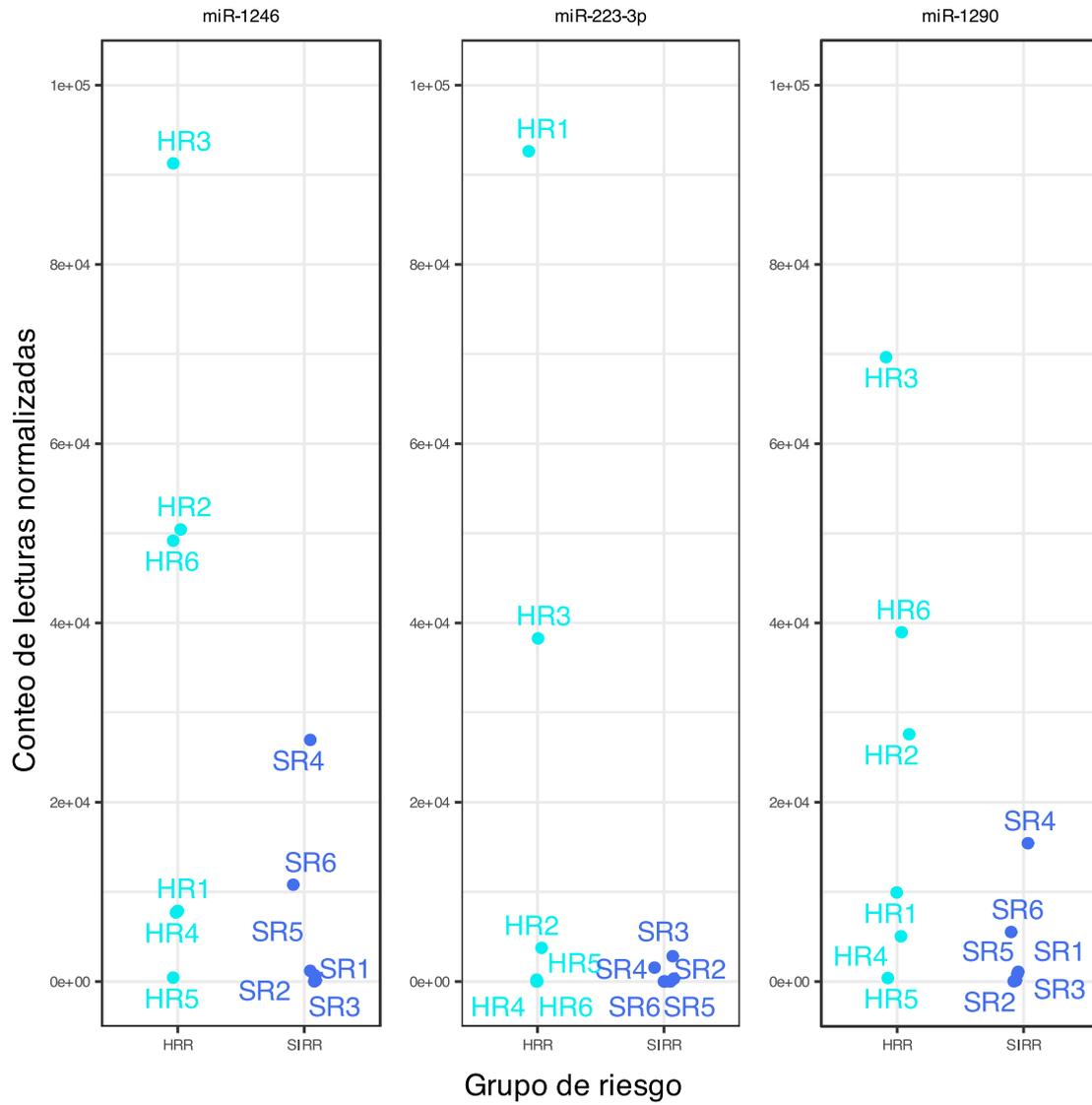


Figura 14. Conteos de lectura de los 3 microRNAs con los mayores grados de sobreexpresión en saliva

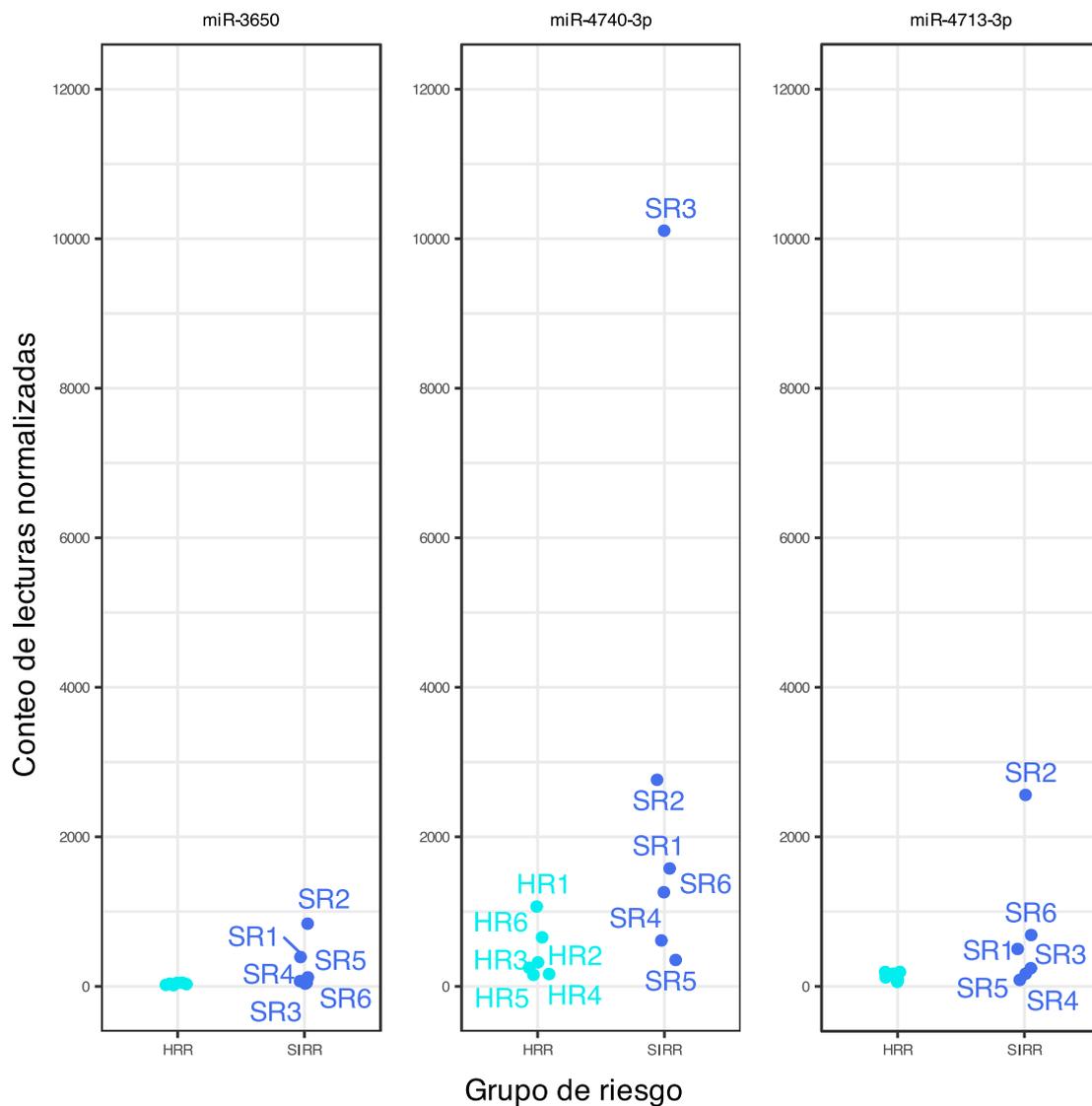


Figura 15. Conteos de lectura de los 3 microRNAs con los mayores grados de subexpresión en saliva

5.2.2. ANÁLISIS DE sRNA-SEQ EN ORINA

Evaluación de la calidad de las muestras secuenciadas

Todas las muestras de orina analizadas pasaron la evaluación de calidad. El valor del cuantil 90 para el código ASCII fue de 70 para todas las muestras. En la mayoría de las muestras (5 de 6) se observaron picos notorios en el conteo de lecturas en la region alrededor de lecturas de una longitud de 22-25 nucleótidos, correspondientes a los microRNAs. La única muestra que no mostró un pico notable en esta longitud fue la SR1.

Exploración del conteo de lecturas en orina previo a la normalización

La mediana y el valor máximo del conteo de lecturas no normalizadas para cada muestra se describe en la tabla 9, mientras que la distribución gráfica del conteo de lecturas se muestra en la figura 16. Se observó una tendencia hacia conteos de lectura más altos en el grupo de muestras 4, 5 y 6, independientemente del grupo de riesgo.

Tabla 9. Mediana y valor máximo del conteo de lecturas crudas para las muestras de orina

Muestra	Mediana	Valor máximo	Muestra	Mediana	Valor máximo
SR1	17.5	96,100	HR1	98	336,367
SR2	93	143,222	HR2	145	167,577
SR3	254.5	1,303,904	HR3	73	39,032
SR4	183	117,830	HR4	243	120,632
SR5	77	99,824	HR5	63.5	84,721
SR6	410	160,509	HR6	138	66,433

SR: riesgo estándar-intermedio, HR: riesgo alto.

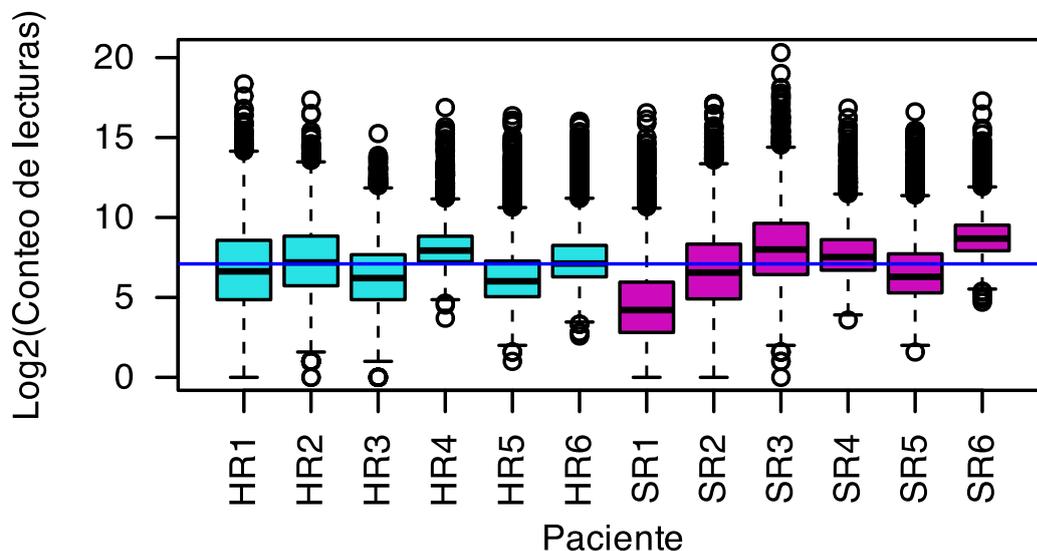


Figura 16. Distribución del conteo de lecturas no normalizadas en orina

Línea azul: mediana del conteo de lecturas. SR: riesgo estándar-intermedio, HR: riesgo alto.

La tendencia se confirmó en el gráfico de densidad de recuento de lecturas, donde se observó que las curvas correspondientes a las muestras HR4, HR5, HR6, SR4, SR5 y SR6 (curvas verde y violeta) se desplazaron más hacia la derecha en comparación con el resto de las muestras, lo que sugiere una mayor densidad de conteos de lectura más altos (figura 17).

También fue evidente que la muestra SR1 presentó una mayor densidad de conteos igual a 1 (pico a la altura de un \log_2 de 0) en comparación con el resto de las muestras.

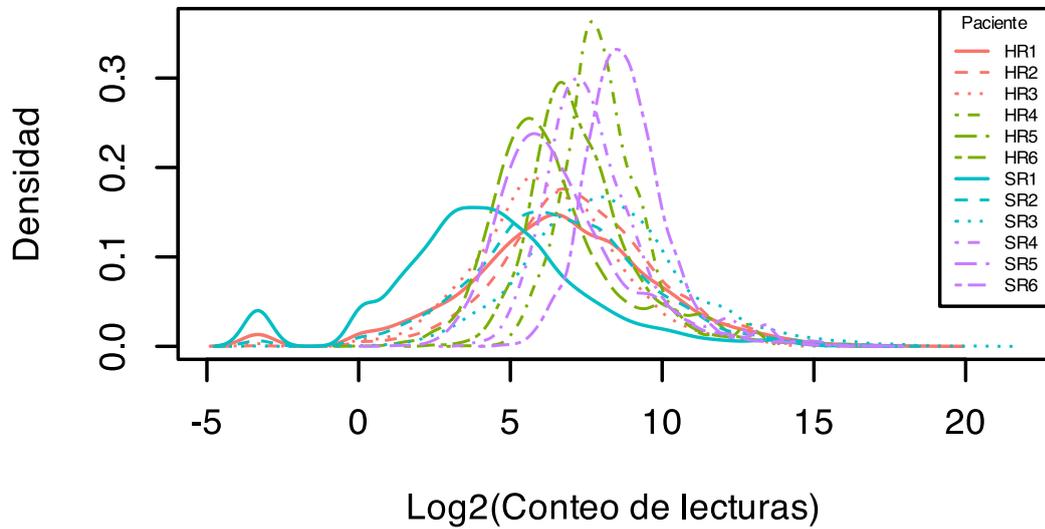


Figura 17. Densidad del conteo de lecturas no normalizadas en orina

SR: riesgo estándar-intermedio, HR: riesgo alto.

Exploración del conteo de lecturas en orina posterior a la normalización

La mediana y el valor máximo del conteo de lecturas normalizadas para cada muestra se describe en la tabla 10, mientras que la distribución gráfica del conteo de lecturas se muestra en la figura 18. Como se esperaba después de aplicar la normalización, las medianas de las muestras se volvieron homogéneas (figura 18).

Tabla 10. Mediana y valor máximo del conteo de lecturas normalizadas para las muestras de orina

Muestra	Mediana	Valor máximo	Muestra	Mediana	Valor máximo
SR1	106	566,027.9	HR1	105.1	357,050.9
SR2	112.5	171,408.14	HR2	110.3	126,579.63
SR3	110.7	559,630.6	HR3	120.22	63,412.87
SR4	125.95	80,219.51	HR4	127.92	63,244.77
SR5	105.01	134,391.82	HR5	105.82	140,078.29
SR6	128.57	49,969.13	HR6	111.52	53,300.40

SR: riesgo estándar-intermedio, HR: riesgo alto.

De igual forma, en el gráfico de densidad se observó que todas las curvas presentaron la misma tendencia hacia un mayor número de lecturas entre un \log_2 de 5 (32 lecturas) y un \log_2 de 10 (1024 lecturas), aunque las muestras 4, 5 y 6 exhibieron un pico más pronunciado en esta área independientemente del grupo de riesgo, en comparación con las muestras 1, 2 y 3 (figura 19). Esto indica que las muestras 4, 5 y 6 presentaron una mayor densidad de microRNAs con conteos de lectura entre estos valores.

Los conteos de lectura iguales a 1 (pico en un \log_2 de 0) en la muestra SR1 se mantuvieron después de la normalización. Las lecturas normalizadas se utilizaron para realizar el posterior DEA.

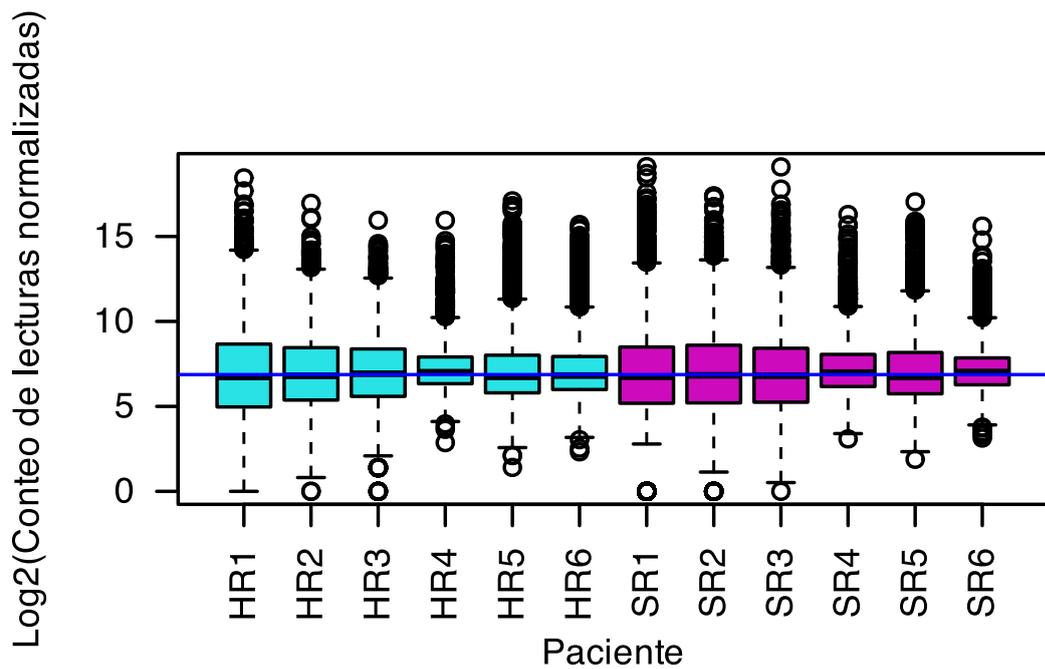


Figura 18. Distribución del conteo de lecturas normalizadas en orina

Línea azul: mediana del conteo de lecturas. SR: riesgo estándar-intermedio, HR: riesgo alto.

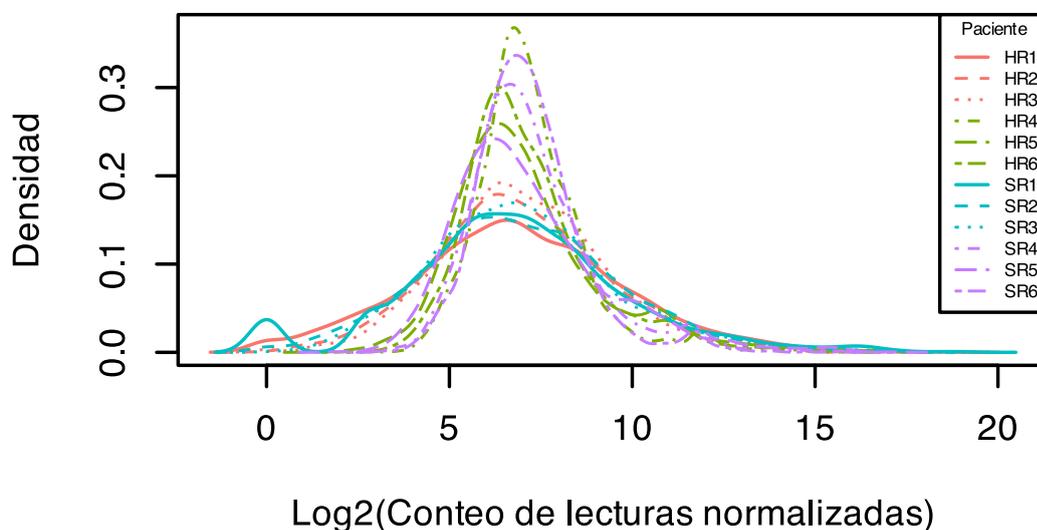


Figura 19. Densidad del conteo de lecturas normalizadas en orina

SR: riesgo estándar-intermedio, HR: riesgo alto.

Agrupamiento y correlación de muestras de orina

De forma similar que en las muestras de saliva, no se observó un patrón de agrupamiento de las muestras de orina de acuerdo al grupo de riesgo de recaída (figura 20). Por este motivo, se decidió explorar la posible influencia de otros factores técnicos y biológicos (lote de secuenciación, sexo, edad, perfil citogenético, perfil molecular y respuesta a prednisona del paciente) sobre el perfil de expresión de los microRNAs, realizando nuevos análisis de PCA con todos estos factores. Aunque no se observó ningún patrón notable de agrupamiento de las muestras bajo ninguno de los factores biológicos evaluados (figuras 36-40 del Anexo 7), sí fue evidente un patrón de agrupamiento según el lote de secuenciación (figura 21).

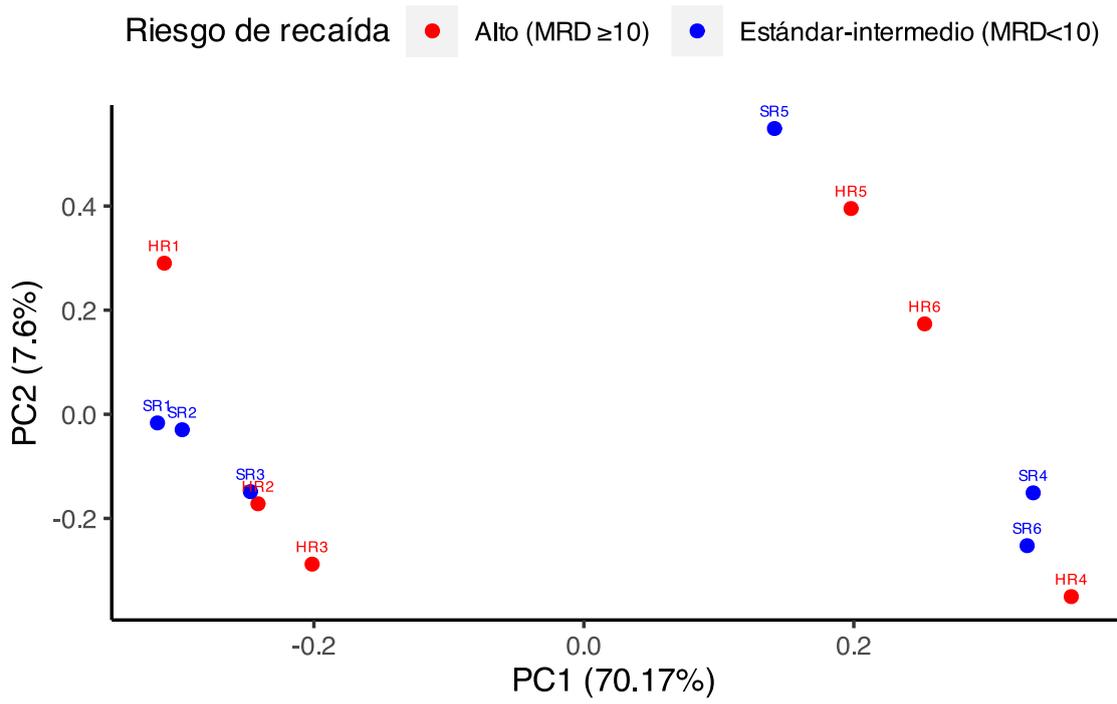


Figura 20. PCA según grupo de riesgo, en orina

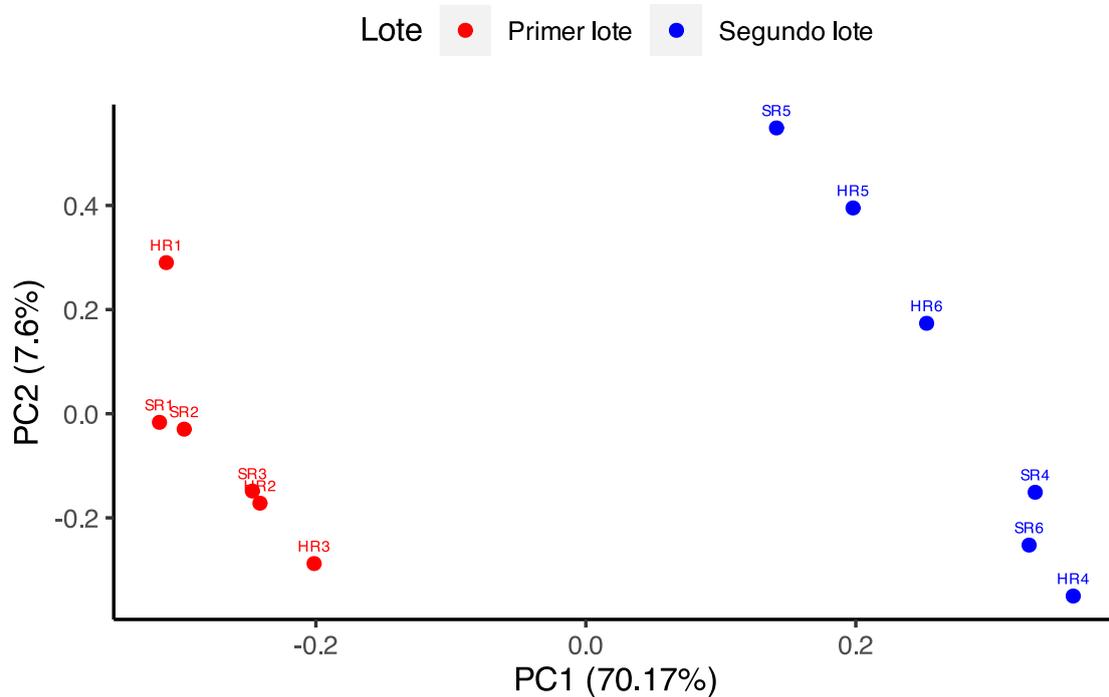


Figura 21. PCA según lote de secuenciación, en orina

El análisis de correlación mostró que la correlación entre las muestras HR2 y SR3 fue la más alta ($r = 0.95$) entre todos los pares analizados, seguida de los pares HR4 y SR4, y HR3 y HR2 ($r = 0.94$) (figura 22). En total, se identificaron 16 combinaciones de muestras de un total de 132 (12%) con un valor de r mayor o igual a 0.90 (7 más que en saliva).

Asimismo, se observó una separación de las muestras en 2 clusters principales en función del lote de secuenciación e independientemente del grupo de riesgo de recaída (figuras 20 y 21). Debido a que el lote de secuenciación demostró influir en los resultados de la expresión de los microRNAs, se decidió incluir este factor en el DEA utilizando DeSeq2.

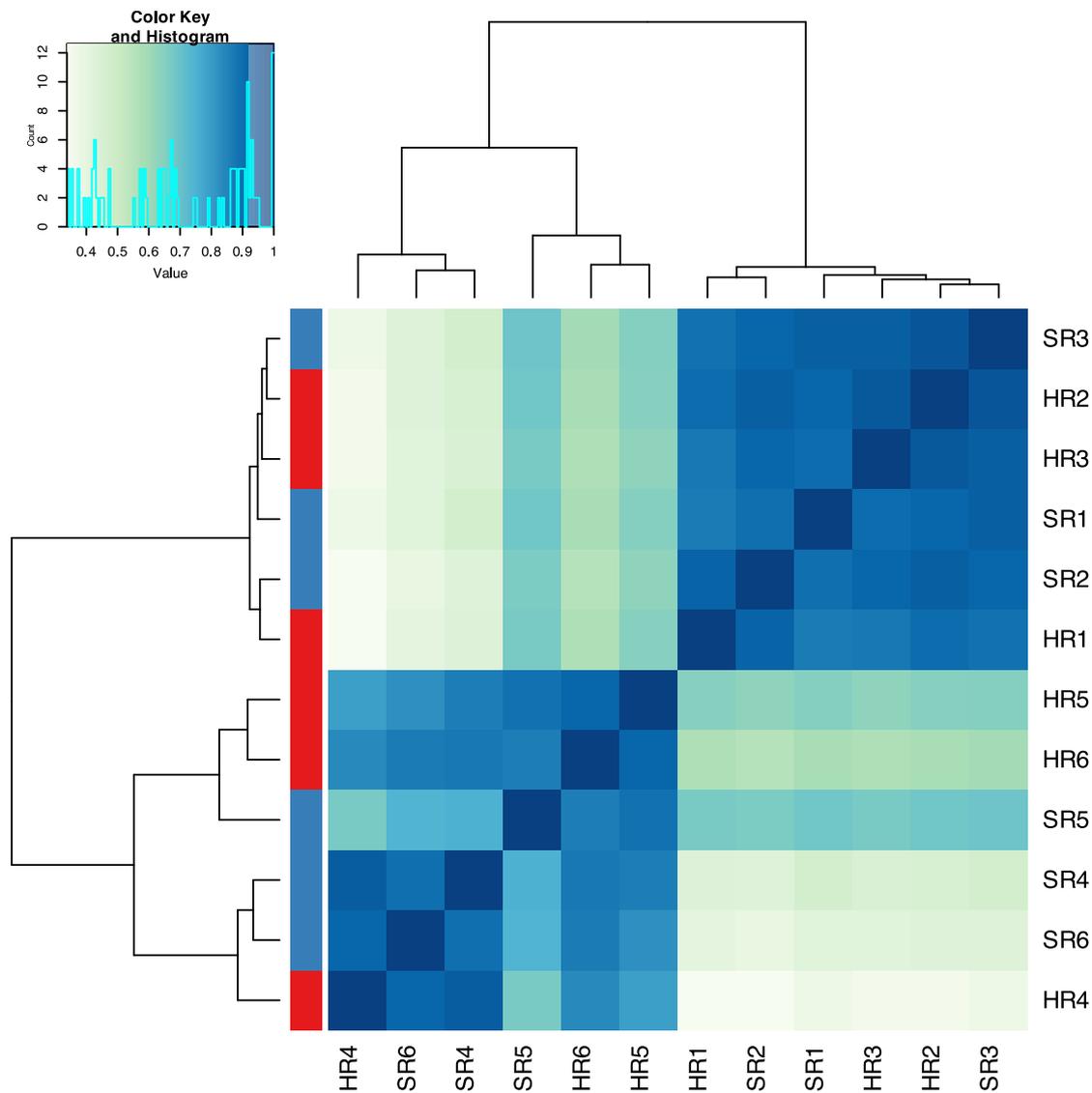


Figura 22. Mapa de calor basado en la correlación entre muestras de orina

En la esquina superior izquierda se muestra un histograma de los valores utilizados para construir el mapa de calor junto con el rango de color correspondiente a cada valor. Por otro lado, el dendrograma que sobresale del mapa indica la distancia en cuanto al patrón de expresión de microRNAs entre muestras. La intensidad del color en el mapa de calor está directamente relacionada con el nivel de correlación entre las muestras. Los niveles más altos están representados por colores más oscuros, mientras que los niveles inferiores están representados por colores más claros.

Análisis de expresión diferencial en orina

El DEA pudo identificar sólo 2 microRNAs expresados diferencialmente entre el grupo de riesgo alto y el grupo de riesgo estándar-intermedio en orina (p ajustado < 0.05) (figura 23). El \log_2 FC y el valor de p ajustado se muestran en la tabla 11. Ambos microRNAs estuvieron subexpresados en el grupo de riesgo alto en comparación con el grupo de riesgo estándar-intermedio.

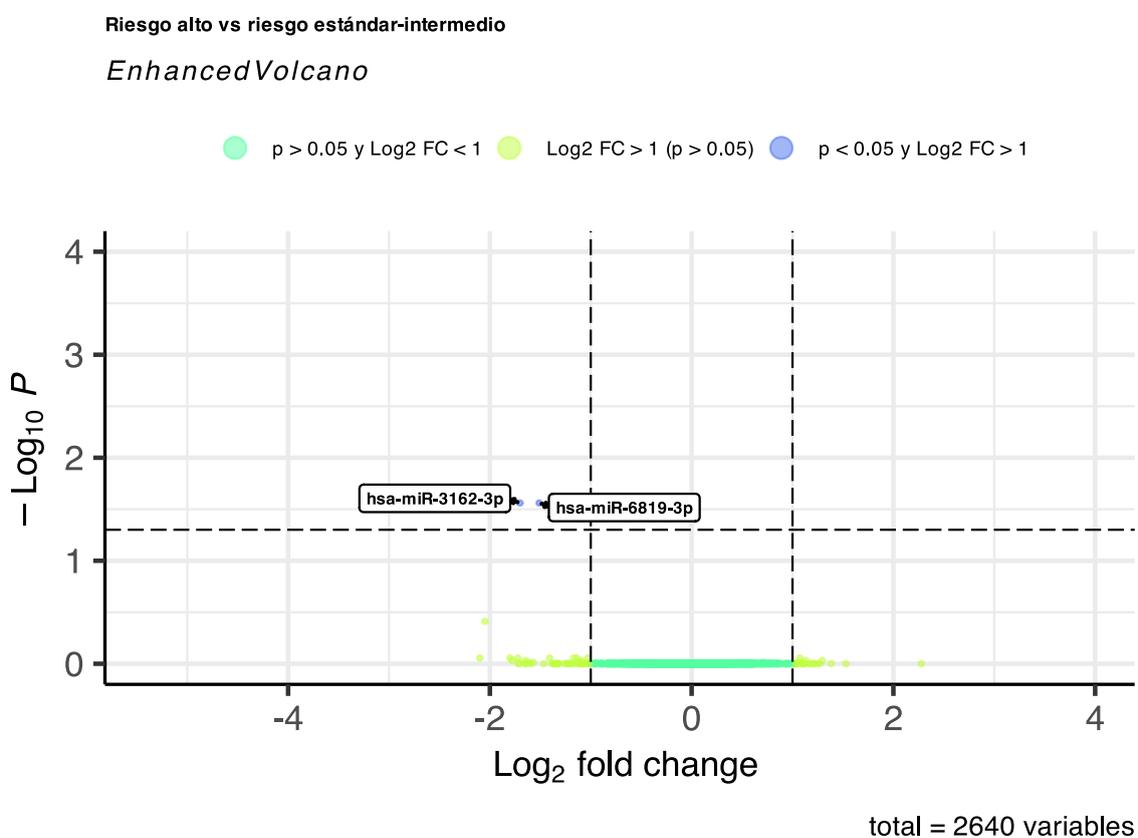


Figura 23. Volcano plot con los resultados del DEA en orina

Un valor de \log_2 FC igual a 1 se interpreta como un incremento o una reducción del 50% en la expresión de un determinado microRNA en el grupo de riesgo alto en comparación con el grupo de riesgo estándar-intermedio.

Tabla 11. Promedio de lecturas, log₂ FC y valor de p para los 2 microRNAs expresados diferencialmente en orina

microRNA	Promedio de lecturas	Log ₂ FC	p-ajustado
miR-3162-3p	443.11	-1.70	0.027
miR-6819-3p	223.70	-1.51	0.027

El mapa de calor mostró que la subexpresión del miR-3162-3p y miR-6819-3p no fue común a todas las muestras del grupo de riesgo alto, lo que sugirió que la obtención de valores de log₂ FC significativos pudo deberse a valores atípicos en los datos (figura 24). Por esta razón, se construyeron gráficos de puntos para el conteo de lecturas normalizadas (figura 25).

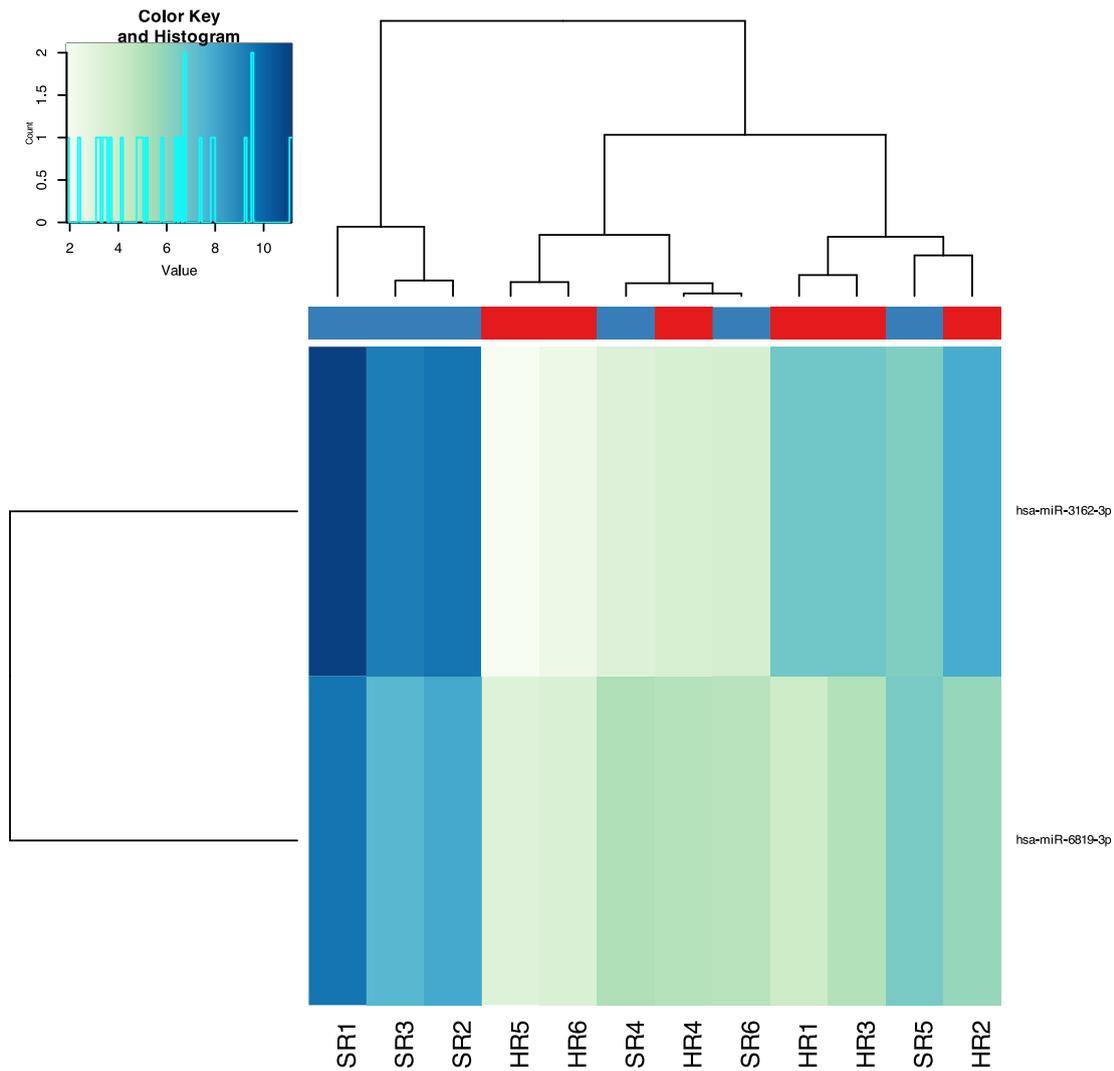


Figura 24. Mapa de calor para los 2 microRNAs expresados diferencialmente en orina

En la esquina superior izquierda se muestra un histograma de los valores utilizados para construir el mapa de calor junto con el rango de color correspondiente a cada valor. Por otro lado, el dendrograma horizontal que sobresale del mapa indica la distancia en cuanto al patrón de expresión de microRNAs entre muestras; mientras que el dendrograma vertical, la distancia en cuanto al patrón de expresión entre los microRNAs expresados diferencialmente. La intensidad del color en el mapa de calor está directamente relacionada con el nivel de expresión de los microRNAs. Los niveles más altos están representados por colores más oscuros, mientras que los niveles inferiores están representados por colores más claros.

Los recuentos de lecturas normalizados de al menos el 50% de las muestras en el grupo de riesgo alto fueron notablemente más altos que los recuentos de lecturas de las muestras en el grupo de riesgo intermedio-estándar para los 2 microRNAs expresados diferencialmente (figura 25), lo que sugiere que las diferencias encontradas son reales y no se deben a valores atípicos en los datos.

Aunque se evidenciaron diferencias notables en la expresión del miR-3162-3p y miR-6819-3p entre el grupo de riesgo alto y el grupo de riesgo estándar-intermedio, se decidió no incluir muestras de orina en la fase de validación debido a la limitada cantidad de microRNAs obtenida durante el proceso de aislamiento de microRNAs que podría haber influenciado fuertemente en la identificación de un mayor número de secuencias expresadas diferencialmente.

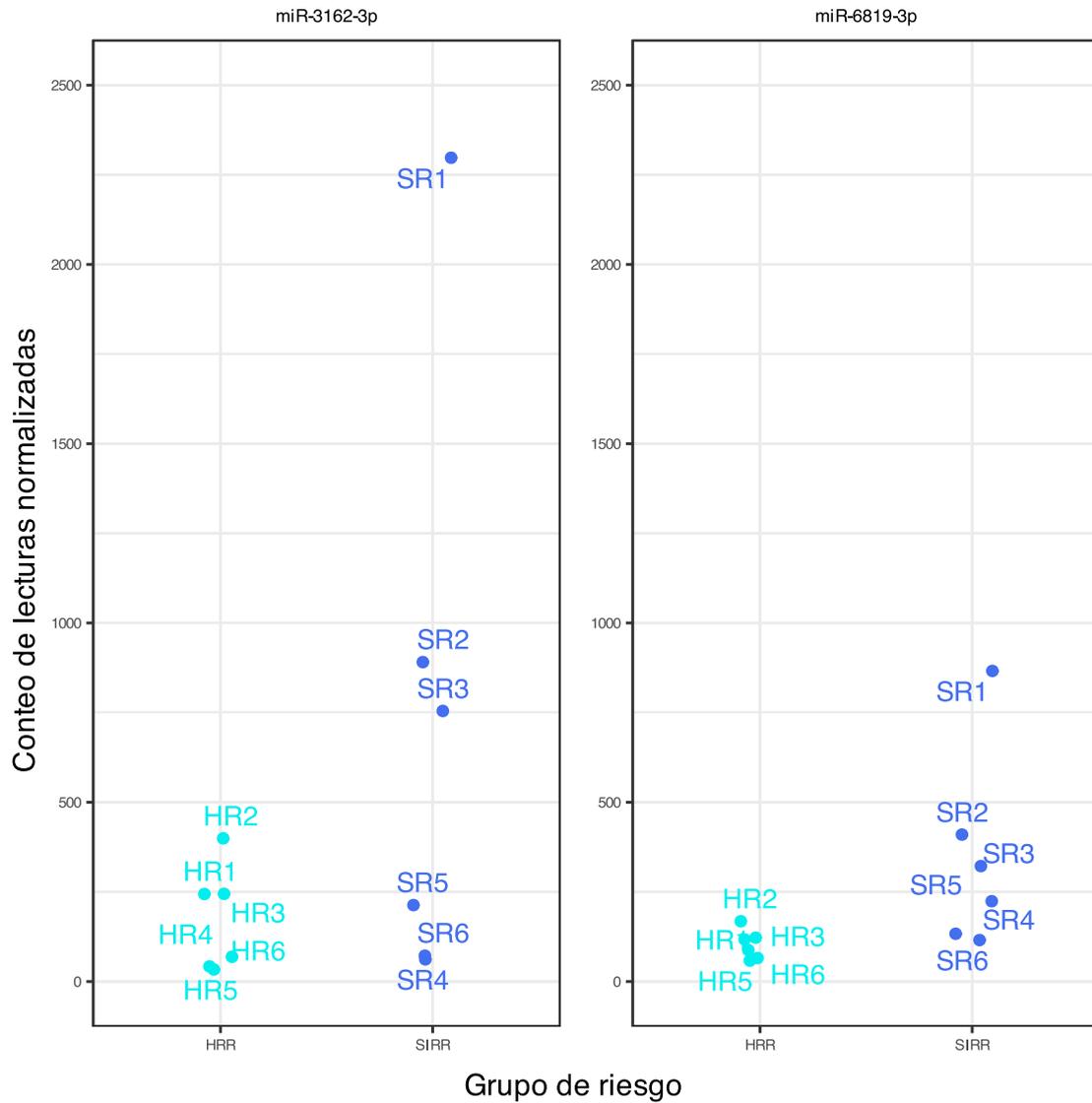


Figura 25. Gráfico de puntos para los conteos de lectura de los 2 microRNAs expresados diferencialmente en orina

5.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CONTROL EXÓGENO (CEL-MIR-39) PARA LA EXTRACCIÓN DE RNA

Los ensayos para la determinación de la concentración óptima de cel-miR-39 se realizaron únicamente en saliva. La ausencia de amplificación observada en algunas muestras fue representada empleando un Cq igual a 40.

En el primer ensayo, se observó que concentraciones de 57.14 y 571.43 pmol/l del control exógeno permitían obtener Cqs de 25 o menores, por lo que se realizaron pruebas adicionales utilizando estas 2 concentraciones (figura 26). En este mismo ensayo, se observó que la muestra 087 no mostró amplificación para cel-miR-39, independientemente de la concentración utilizada, lo que sugirió un problema durante la extracción.

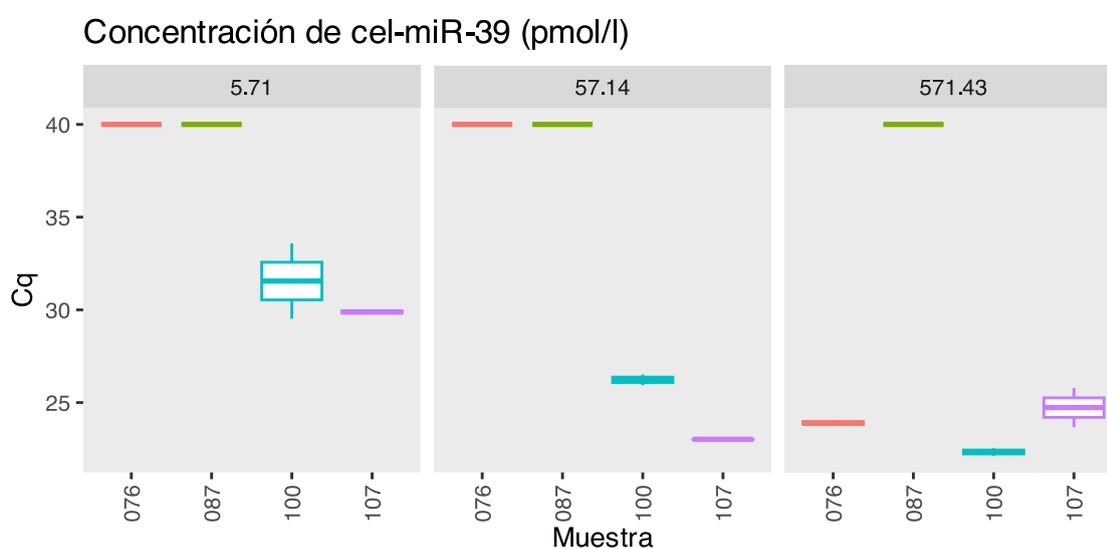


Figura 26. Valores de Cq para el ensayo realizado con concentraciones de cel-miR-39 de 5.71, 57.14 y 571.43 pmol/l en muestras de saliva

En el segundo ensayo, se observó un Cq promedio de 22.06 y desviación estándar de 1.27 para las muestras de saliva que contenían 571.43 pmol/l de cel-miR-39, y un Cq promedio de 26.98 y desviación estándar de 3.88 para las muestras que contenían 57.14 pmol/l de cel-miR-39, (figura 27). Este hallazgo denotó una menor variabilidad de los valores para la primera concentración utilizada (571.43 pmol/l).

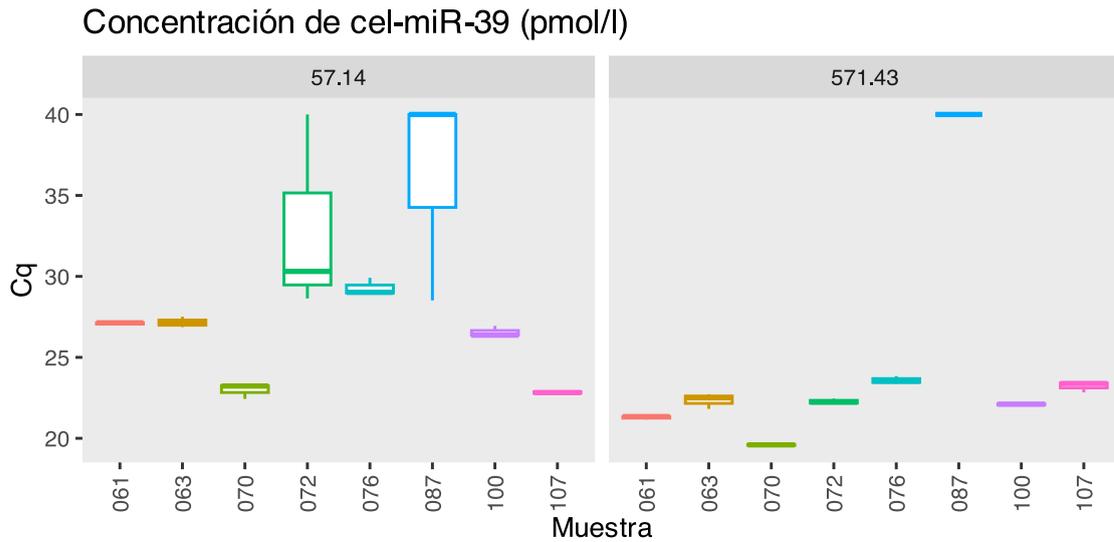


Figura 27. Valores de Cq para el ensayo realizado con concentraciones de cel-miR-39 de 57.14 y 571.43 pmol/l en muestras de saliva

En este segundo ensayo, se volvió a observar la ausencia de amplificación de cel-miR-39 en la muestra 087, lo que confirmó un problema durante la extracción. Excluyendo esta muestra, el rango de valores de Cq para la concentración de 571.43 pmol/l fue de 19.53-23.84, mientras que para la concentración de 57.14 pmol/l fue de 22.43-40.

En base a estos resultados, se decidió utilizar una concentración final de cel-miR-39 de 571.43 pmol/l.

5.4. DETERMINACIÓN DE MICRORNAS DE REFERENCIA PARA EL ANÁLISIS MEDIANTE RT-qPCR

Ninguno de los 3 microRNAs de referencia candidatos seleccionados a partir de los resultados del secuenciación (miR-6749-5p, miR-12121 y miR-6722-3p) fueron detectados

mediante RT-qPCR. Sin embargo, se observó amplificación para el miR-16-5p y miR-25, los microRNAs candidatos sugeridos por la literatura.

El análisis en geNorm identificó al miR-16-5p y miR-25 como los microRNAs más estables, de acuerdo al valor-M (figura 28 y tabla 12). La media geométrica del Cq de estos 2 microRNAs fue empleada para la normalización de la expresión de los microRNAs analizados durante la fase de validación técnica y clínica.

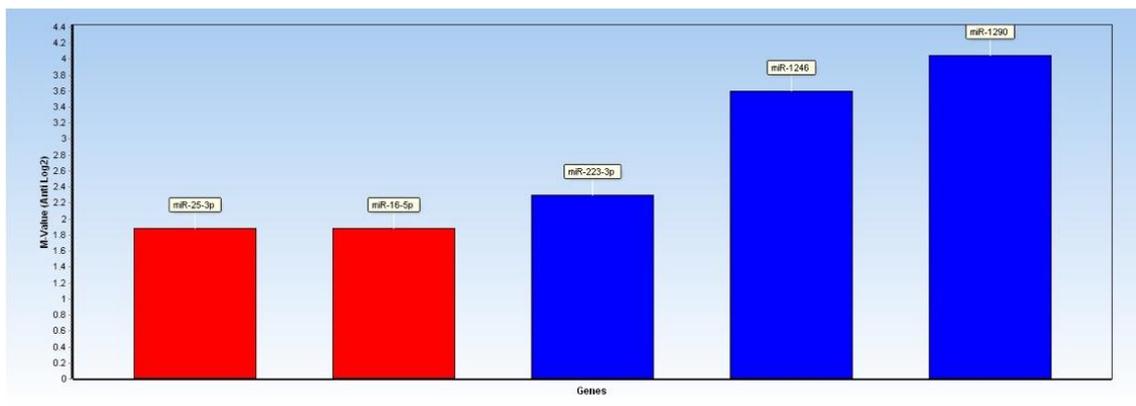


Figura 28 Resultados del análisis de geNorm de los microRNAs analizados

M-Value: Valor-M.

Tabla 12 Valores-M para los microRNAs analizados

microRNA	Valor-M
miR-1290	4.04
miR-1246	3.60
miR-223-3p	2.30
miR-16-5p	1.88
miR-25-3p	1.88

5.5. VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN SALIVA
MEDIANTE RT-qPCR

Durante la fase de validación técnica, se evaluó la expresión de los 3 microRNAs que mostraron los niveles más altos de sobreexpresión en saliva (miR-1290, miR-223-3p, miR-1246), empleando 3 muestras de cada grupo de riesgo analizadas durante la fase exploratoria. No fue posible analizar las 6 muestras de cada grupo de riesgo incluidas inicialmente en esta fase debido a que el volumen de ARN era insuficiente y no se contaba con una alícuota adicional de la muestra original para repetir la extracción.

El promedio del ΔCq en cada grupo de riesgo y FC para cada microRNA se muestra en la tabla 13. Los resultados obtenidos confirmaron el aumento de la expresión de los 3 microRNAs en el grupo de riesgo alto (ΔCq en el grupo de riesgo alto $<$ ΔCq en el grupo de riesgo estándar-intermedio).

Tabla 13. Promedio del ΔCq , FC y valor de p para el miR-1290, miR-223-3p y miR-1246 (fase de validación técnica)

microRNA	Promedio del ΔCq en el GRA	Promedio del ΔCq en el GRSI	FC ($2^{-\Delta\Delta Cq}$)	Log ₂ FC
miR-1290	1.50	1.62	1.09	0.12
miR-223-3p	-1.63	1.17	6.98	2.80
miR-1246	-0.56	-0.31	1.19	0.25

GRA: Grupo de riesgo alto, GRSI: Grupo de riesgo estándar-intermedio. El ΔCq se calculó mediante la fórmula: Cq del microRNA de interés – Media geométrica del Cq del miR-16-5p y miR-25. N en el GRA = 23 pacientes, y n en el GRSI = 26 pacientes.

5.6. DETERMINACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LOS MICRORNAS CIRCULANTES EN SALIVA

5.6.1. MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MICRORNAS

En base a los resultados de la fase exploratoria y la fase de validación técnica, se seleccionó al miR-1290, miR-223-3p, miR-1246 para ser analizados durante la fase de validación clínica. Para el miR-223-3p, los datos correspondientes a la muestra HR111 del grupo de riesgo alto se eliminaron porque representaba un valor atípico.

El promedio del ΔCq , FC y valor de p para cada microRNA se muestra en la tabla 14. La expresión del miR-223-3p fue mayor en el grupo de riesgo alto en comparado al grupo de riesgo estándar-intermedio ($p < 0.05$). Este incremento fue de más del doble (FC = 2.28) (figura 29).

Tabla 14. Promedio del ΔCq , FC y valor de p para el miR-1290, miR-1246 y miR-223-3p (fase de validación clínica)

microRNA	Promedio del ΔCq en el GRA	Promedio del ΔCq en el GRSI	FC ($2^{-\Delta\Delta Cq}$)	Log ₂ FC	Valor de p
miR-1290	2.28	0.85	0.40	-1.32	0.328
miR-1246	-0.19	-1.08	0.46	-1.13	0.557
miR-223-3p	-1.07	0.27	2.28	1.19	0.025*

GRA: Grupo de riesgo alto, GRSI: Grupo de riesgo estándar-intermedio. El ΔCq se calculó mediante la fórmula: Cq del microRNA de interés – Media geométrica del Cq del miR-16-5p y miR-25. N en el GRA = 23 pacientes, y n en el GRSI = 26 pacientes.

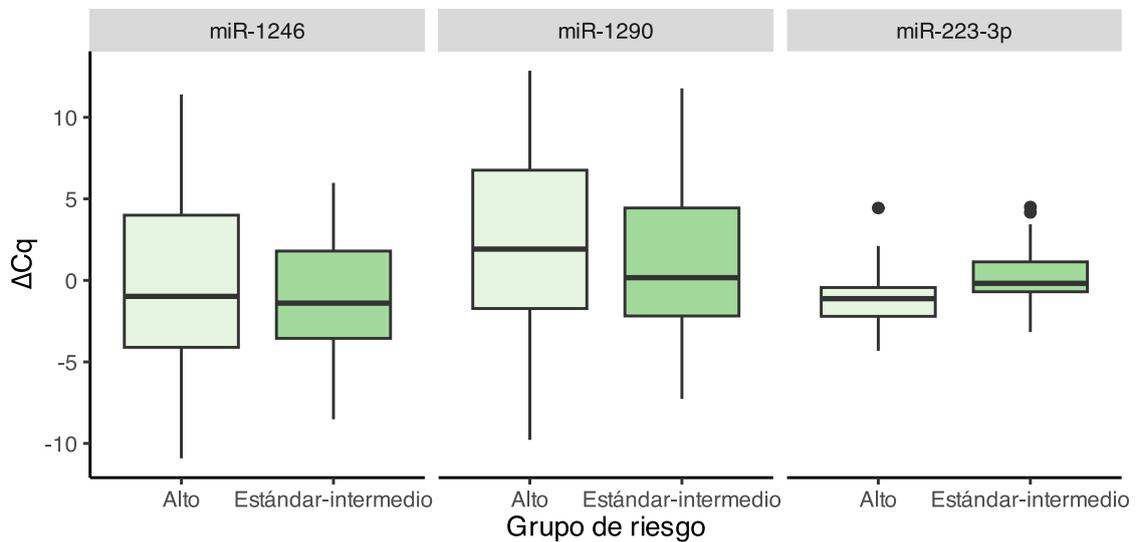


Figura 29 ΔCq para el miR-1290, miR-1246 y miR-223-3p, en cada grupo de riesgo

5.6.2. ANÁLISIS DE CURVAS ROC

El análisis de curvas ROC demostró que el uso individual del miR-223-3p y el uso combinado del miR-1290, miR-223-3p y miR-1246 permiten discriminar entre pacientes con alto riesgo de recaída y pacientes con un riesgo estándar-intermedio con un AUC = 0.71 (IC 95%: 0.55-0.86, valor de p = 0.010) y AUC = 0.72 (IC 95%: 0.57-0.87, valor de p = 0.004), respectivamente (figura 30).

El uso combinado de los 3 microRNAs no aumentó significativamente la capacidad discriminadora individual del miR-223-3p (Prueba DeLong, p = 0.8238).

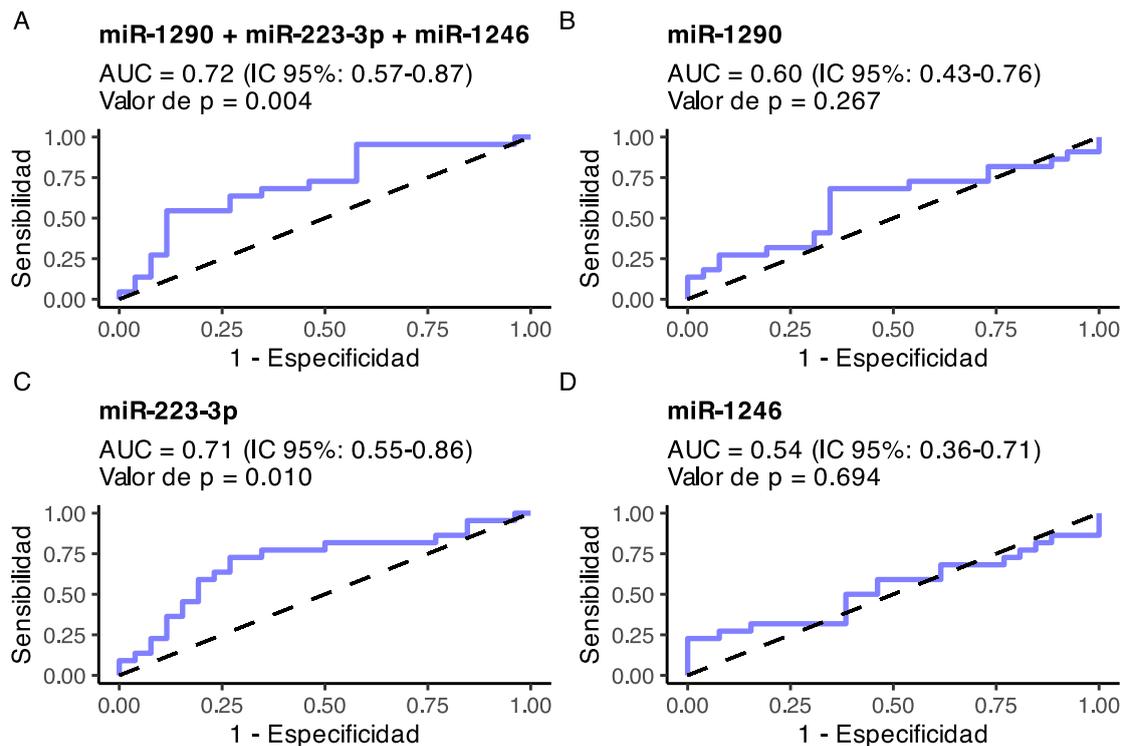


Figura 30 Valores de AUC para el miR-1290, miR-223-3p, miR-1246 y la combinación de los 3 microRNAs

La tabla 15 muestra la sensibilidad, especificidad y punto de corte para la relación entre el Cq del microRNA de interés y la media geométrica del Cq de los microRNA de referencia que maximiza estos parámetros. La máxima sensibilidad y especificidad observada corresponde al miR-223-3p, con un punto de corte de 0.98.

Tabla 15 Punto de corte óptimo, sensibilidad y especificidad para el miR-1290, miR-223-3p y miR-1246

microRNA	Punto de corte óptimo	Sensibilidad	Especificidad
miR-1290	1.04	0.68	0.65
miR-223-3p	0.98	0.73	0.73
miR-1246	1.27	0.23	1.00

6. DISCUSIONES

En el presente estudio, se identificaron microRNAs circulantes en saliva y orina que se encontraban expresados diferencialmente entre un grupo de niños diagnosticados con LLA con un riesgo alto de recaída y un grupo con un riesgo estándar-intermedio de recaída. Este es el primer estudio a nivel mundial que explora el perfil de expresión de los microRNA circulantes en la saliva y la orina de niños diagnosticados con leucemia. Los hallazgos proporcionan evidencia preliminar sobre el potencial empleo de estas secuencias como biomarcadores para medir la EMR en la LLA pediátrica y determinar el riesgo de recaída del paciente.

Los resultados del DEA realizado con la data proveniente del sRNA-Seq en saliva mostraron que el miR-1246, miR-223-3p y miR-1290 presentaron los niveles más altos de sobreexpresión en el grupo de riesgo alto. Estos 3 microRNAs han sido previamente implicados en la patogénesis de las leucemias agudas, sugiriendo su rol como secuencias promotoras de tumores (oncomiRs).

La sobreexpresión del miR-1246 ha sido reportada en líneas celulares leucémicas resistentes a la quimioterapia y en pacientes con leucemia en recaída. El cambio en la expresión (FC) del miR-1246 en líneas celulares multirresistentes a la quimioterapia vs líneas no multirresistentes alcanzó un valor de 17.41 (115). La inhibición de este microRNA *in vitro* permitió incrementar la sensibilidad a la doxorrubicina, promover la detención del ciclo celular en la fase G0/G1 e inducir la apoptosis celular, lo que demuestra su rol como oncomiR en la progresión de la leucemia (115,116). Además, se identificó que las proteínas de la vía de señalización Wnt/ β -catenina: AXIN2 y GSK-3 β , constituyen blancos directos

del miR-1246, y que la sobreexpresión de este microRNA conduce a una disminución en la expresión de estas proteínas, promoviendo la activación de la vía oncogénica Wnt/ β -catenina (115). Un blanco adicional del miR-1246 sería el supresor de tumores CADM1, cuya expresión se correlaciona inversamente con la expresión de este microRNA (116). La disminución de la expresión de CADM1 da como resultado una alta tasa de proliferación y una baja tasa de apoptosis, así como una fuerte resistencia a los agentes quimioterapéuticos a través de la acción sobre los complejos CDK/ciclina.

La expresión anormal del miR-1246 también ha sido reportada en la leucemia mieloide aguda (LMA). En este caso, la sobreexpresión de este microRNA en vesículas extracelulares de plasma y suero de pacientes y ratones con xenoinjertos ha sido asociada con el desarrollo y progresión de LMA (117,118). En el suero, se observó un incremento significativo de la expresión del miR-1246 en el día 21 posterior a la aplicación del xenoinjerto en ratones leucémicos en comparación con ratones control; mientras que en plasma, se observó un incremento del nivel de expresión de este microRNA en pacientes con LMA en comparación con individuos sanos. Adicionalmente, los niveles del miR-1246 fueron significativamente más altos en pacientes con una EMR elevada (> 20%) después de la terapia de inducción, lo que sugiere su potencial rol como biomarcador mínimamente invasivo para monitorear la respuesta al tratamiento (117).

El incremento de la expresión del miR-1246 también ha sido descrito *in vitro* en vesículas extracelulares secretadas en el medio condicionado de líneas celulares de LMA (119). En este caso, el FC del miR-1246 fue de 3.72, y se observó que la adición de exosomas que contenían esta secuencia a cultivos celulares de células madre leucémicas promovía la supervivencia de estas células. Asimismo, fue evidente que el volumen y el peso del tumor

en ratones inyectados con células de LMA disminuyeron significativamente después de la inyección de un inhibidor del miR-1246 en comparación con la inyección de un inhibidor de exosomas. La acción del miR-1246 para promover el inicio de la leucemogénesis se produciría mediante la inhibición de la proteína supresora de tumores LRIG1, que conduce a la activación de la vía oncogénica STAT3. El aumento de la expresión del miR-1246 en vesículas extracelulares excretadas en muestras de pacientes con leucemia aguda y modelos celulares *in vitro* podría explicar la observación de una mayor expresión de este microRNA en la saliva de pacientes con LLA en el presente estudio.

En acuerdo con lo reportado previamente para la LMA, la desregulación de la expresión del miR-1246 también se ha documentado en la LLA pediátrica (120). En este caso, miR-1246 mostró una expresión significativamente elevada en un grupo de pacientes con LLA-T en recaída en comparación con un grupo de pacientes en remisión de la enfermedad (FC = 7.37, $p = 0.003$). Se identificó además que la acción del miR-1246 sobre la promoción de la progresión de la enfermedad se daría en combinación con el miR-1248, posiblemente a nivel de la inhibición de la expresión de CTBP2, un correpresor de la vía de señalización NOTCH2. Asimismo, se determinó que la proteína NOTCH2 coopera con la proliferación celular que promueve miR-1246/1248, contribuyendo a la recaída de la LLA-T.

De forma similar al miR-1246, la sobreexpresión del miR-1290 también ha sido asociada con el desarrollo y la progresión de la leucemia aguda. En ensayos *in vitro*, se observó una mayor expresión de este microRNA en líneas celulares de LLA-B en comparación con líneas celulares de control (121). El aumento en la expresión del miR-1290 pudo inhibirse con resveratrol, un compuesto quimioterapéutico natural. Sin embargo, la acción antitumoral del

resveratrol se vio atenuada por la inhibición de la proteína IGFBP3, lo que sugiere que esta proteína representa un blanco para la acción del miR-1290.

En otro estudio se observó que el nivel de expresión del miR-1290 en células polimorfonucleares fue significativamente más alto en un grupo de niños con LLA en recaída, en comparación con un grupo de pacientes sanos (expresión relativa del miR-1290: 0.18 vs 0.02) (122). La sobreexpresión del miR-1290 se asoció con una disminución en los niveles de la enzima NAT1, blanco de acción de este microRNA. La desregulación de la expresión o actividad de la enzima NAT1 ha sido implicada en el desarrollo de cáncer, por lo que la acción del miR-1290 sobre NAT1 podría estar relacionada con la progresión de la LLA.

También se ha reportado una mayor expresión del miR-1290 en muestras de médula ósea de pacientes pediátricos con LLA-B que recayeron en comparación con pacientes que no recayeron (123). En este caso, la presencia de niveles altos del miR-1290 (niveles por encima del 3er cuartil) ocasionó una disminución en la supervivencia libre de recaída (SLR) del 80% al 62% ($p=0.025$). De manera similar, se identificó una diferencia significativa en la SLR entre pacientes con niveles altos y bajos del miR-151-5p y miR-451 (miR-151-5p: 80% vs 56%, $p=0,007$; miR-451: 78% vs. 63%, $p=0,042$). Ambos microRNAs estuvieron subexpresados en pacientes que recayeron en comparación con pacientes que no recayeron. En base a estos resultados, se decidió construir un perfil basado en la presencia de niveles altos del miR-1290 y niveles bajos del miR-151-5p y miR-451 (perfil A). La presencia del perfil A en pacientes con LLA-B se asoció con una disminución significativa de la SLR del 77% al 29% ($p<0.0001$) y con un riesgo 10.5 veces mayor de recaída.

Con respecto al miR-223-3p, un estudio previo demostró que niveles elevados de este microRNA promovían la proliferación, migración e invasión de células LLA-T, mientras que restringían la apoptosis; hallazgos que sugerían el rol potencial del miR-223-3p como oncomiR (124). De manera similar, se observó que la sobreexpresión del miR-223-3p revirtió parcialmente el efecto inhibitor de la sobreexpresión de circRNA_0000094 sobre los fenotipos malignos. Los resultados sugirieron que circRNA_0000094 participaba en la regulación de la proliferación, apoptosis, migración e invasión de células LLA-T mediante la inhibición de la acción oncogénica del miR-223-3p. En este mismo estudio, se identificó a FBXW7 como un blanco del miR-223-3p, un supresor de tumores responsable de dirigir la proteólisis de oncoproteínas mediada por ubiquitina. Anteriormente, se describió una relación inversa entre el nivel de expresión del miR-223-3p y FBXW7 (125). Esta interacción estaría a su vez regulada por la actividad de las proteínas de la familia NOTCH (NOTCH1 y NOTCH3), cuya acción desregulada está implicada en el desarrollo de la LLA-T. Otro blanco propuesto para el miR-223-3p es TAL1. En este caso, también se documentó una relación inversa entre el nivel de expresión del miR-223-3p y TAL1, un factor de transcripción oncogénico que regula negativamente el supresor tumoral FBXW7 (125).

También se ha observado la sobreexpresión del miR-223-3p en la leucemia prolinfocítica de células T en adultos (FC = 9.85, $p = 0.0002$) (126). El aumento de la expresión del miR-223-3p en esta patología se relacionó con alteraciones en las vías de señalización implicadas en la respuesta al daño del ADN y la supervivencia celular. Además, se identificó a FOXO1, una proteína supresora de tumores, como un blanco del miR-223-3p, observándose una subexpresión significativa de esta proteína en pacientes con leucemia prolinfocítica de células T en comparación con controles sanos. Finalmente, los niveles altos de expresión del miR-223-3p (niveles en el tercil superior) se asociaron con una supervivencia reducida en

comparación con niveles bajos de expresión (niveles en el tercil inferior) (14 vs 26 meses, $p=0.001$).

En contraste con lo previamente descrito, se ha reportado la subexpresión del miR-223-3p en pacientes con LMA en comparación con individuos sanos (127). La baja expresión de este microRNA (niveles por debajo de la mediana global) se asoció con grupos citogenéticos de pronóstico desfavorable o intermedio y la presencia de $\geq 50\%$ de blastos en médula ósea al diagnóstico. Además, los pacientes que presentaron niveles bajos de expresión del miR-223-3p tuvieron tasas de supervivencia más cortas que los pacientes con niveles altos. Finalmente, se determinó que niveles bajos del miR-223-3p representaban un factor pronóstico para la supervivencia de pacientes con LMA.

Es importante señalar que los estudios previos que exploraron el papel del miR-1246, miR-1290 y miR-223-3p en el desarrollo y progresión de la leucemia emplearon muestras biológicas distintas de la saliva u orina, incluidos cultivos celulares, suero, plasma y médula ósea. Hasta la fecha, sólo se ha detectado la presencia del miR-1246, miR-1290 y miR-223-3p en la saliva y orina de pacientes con tumores sólidos, y se ha evaluado la desregulación de su expresión como un potencial biomarcador diagnóstico y pronóstico.

En el cáncer de próstata, se reportó una mayor expresión del miR-1290 en la orina de personas con la patología en comparación con personas con hiperplasia prostática benigna e individuos sanos (128). Asimismo, la presencia de niveles elevados del miR-1290 en orina se asoció con la presencia de metástasis ($p = 0.026$). En este mismo tipo de cáncer, también se ha descrito la sobreexpresión del miR-1290 en pacientes con cáncer de próstata grado 3 respecto a pacientes con cáncer de próstata grado 1 (FC = 2.82, $p = 0.015$) (129). En este

caso, se reportó que la expresión de este microRNA representó un marcador útil para diferenciar entre ambos grupos, con un poder discriminatorio alto (AUC = 0.84).

También se ha documentado la sobreexpresión del miR-1246 en la orina de personas diagnosticadas con cáncer gástrico en comparación con controles sanos (FC = 5.75, p = 0.044) (130). En este caso, un hallazgo que llamó la atención fue la observación de niveles apenas detectables del miR-1246 en tejidos cancerosos gástricos o en tejidos no cancerosos adyacentes, lo que sugiere que el patrón de desregulación observado era específico de la orina. Además, el pronóstico de los pacientes con cáncer gástrico no se vio influenciado por los niveles alterados del miR-1246.

La sobreexpresión del miR-1246 también ha sido observada en la orina de pacientes con carcinoma de células escamosas de esófago (131). Al igual que en el estudio anterior, la sobreexpresión del miR-1246 fue específica de las muestras de orina y suero, pero no de la saliva; lo que nuevamente sugiere un patrón de desregulación de microRNAs específico de cada muestra. Adicionalmente, no se observó asociación entre los niveles urinarios del miR-1246 y las características clínico-patológicas como la edad del paciente, el sexo, la profundidad del tumor y la metástasis.

Se ha demostrado que miR-1246 no sólo está sobreexpresado en la orina de pacientes con cáncer sino también en la saliva. En pacientes con cáncer del tracto pancreatobiliar, se reportaron niveles significativamente más altos del miR-1246 en la saliva en comparación con individuos sanos (expresión relativa: 14.7 vs 11.6, p < 0.05) (132). Asimismo, se evidenció una correlación positiva entre los niveles del miR-1246 y CA19-9, un conocido biomarcador sérico de cáncer del tracto pancreatobiliar (r=0.818, p < 0.01).

Con respecto al miR-223-3p, dos estudios previos han analizado la expresión de esta secuencia en muestras de orina de pacientes con tumores sólidos (133,134); sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la expresión anormal de este microRNA en muestras de saliva. Uno de los estudios reportados en orina mostró que la expresión del miR-223-3p era significativamente mayor en pacientes con cáncer de próstata que presentaban progresión de la enfermedad tras la prostatectomía en comparación con pacientes que no presentaban progresión de la enfermedad (FC = 6.9, p = 0.017) (133). El segundo estudio encontró que los pacientes con cáncer de próstata radiorresistente presentaban una mayor expresión del miR-223-3p en orina en comparación con los pacientes con tumores radiosensibles. De manera similar, se identificó que miR-223-3p inhibía la expresión de FOXO3a, una proteína con un papel modulador conocido en la sensibilidad a la radioterapia. Finalmente, se demostró que la sobreexpresión de FOXO3a en células de cáncer de próstata podría eliminar el efecto de radiorresistencia promovido por la sobreexpresión del miR-223-3p (134).

Durante la fase de validación mediante RT-qPCR, se utilizaron 2 microRNAs de referencia para normalizar el nivel de expresión del miR-1246, miR-223-3p y miR-1290: miR-25-3p y miR-16-5p. Previamente, se ha documentado que el papel del miR-16-5p y miR-25-3p en la patogénesis de las leucemias está asociado a la regulación de la expresión del oncogén BCL2, responsable de regular los procesos de apoptosis celular (135). Aunque la expresión alterada de ambos microRNAs se ha asociado con la patogénesis tanto de tumores sólidos como de leucemias, en el presente estudio estos microRNAs demostraron una expresión estable en la saliva de pacientes con LLA, lo cual sugiere que pueden ser empleados en estudios futuros que involucren el análisis de microRNAs mediante RT-qPCR en el mismo tipo de muestras y población de estudio (136–144).

La capacidad de los microRNAs para definir el diagnóstico de LLA y predecir el estado de EMR ha sido ampliamente descrita en la LLA pediátrica y adulta a través del valor de AUC. MicroRNAs individuales presentes en médula ósea, suero y plasma, incluidos miR-367, miR-217, miR-107, miR-16-2-3p, miR-326, miR-335-3p, miR-125b-1, miR-203, miR-30, miR-143, miR-137, miR-101, miR-31, miR-32, miR-132, miR-129 y miR-124, así como paneles que comprenden una combinación de secuencias (miR-155, miR-100, miR-196b, miR-124, miR-223 y miR-92a; miR-155, miR-378, miR-181b, miR-223, miR-100 y miR-210; miR-155, miR-124, miR-181b, miR-100, miR-223 y miR-103a; miR-196b, miR-124, miR-92a, miR-24, miR-100 y miR-181a; miR-125b y miR-203), han mostrado AUC superiores o iguales a 0.80 para el diagnóstico de LLA (26–29,31,52–54).

Entre estos, miR-132, miR-129 y miR-124 exhibieron los valores de AUC más altos (> 0.95), encontrándose subexpresados en muestras de médula ósea de pacientes con LLA en comparación con controles sanos (53). Otros microRNAs que demostraron una excelente capacidad discriminativa (AUC = 0.90-0.95) incluyeron miR-143, miR-137, miR-101, miR-31 y miR-32, que se expresaron de manera aberrante en plasma, sangre total y médula ósea (27,52,53). Entre estos microRNAs, sólo miR-32 mostró niveles de expresión más altos en el grupo con LLA, mientras que los demás mostraron niveles más bajos en el grupo con LLA en comparación con los controles.

Los microRNAs también han mostrado resultados prometedores en la identificación del estado de la EMR en la LLA pediátrica. Tres secuencias, miR-128-3p, miR-335-3p y miR-326 presentes en médula ósea y plasma, han demostrado valores de AUC que oscilan entre 0.80 y 0.97 para discriminar entre estados de EMR en esta población (18,19,28,30). Entre estas secuencias, miR-128-3p demostró el mejor desempeño (AUC = 0.97) para distinguir

a los pacientes con LLA que tienen una EMR superior al 1 % de aquellos que tienen una EMR inferior al 1 % el día 15 de la quimioterapia de inducción (19). Los niveles de este microRNA disminuyeron significativamente el día 15 y el día 33 de quimioterapia en comparación con el día del diagnóstico (diagnóstico-día 15: \log_2 FC = -4,49, $p = 0.000$, y diagnóstico-día 33: \log_2 FC = -2,23, $p = 0.014$), lo que sugiere su rol como un potencial biomarcador de respuesta al tratamiento y progresión de la enfermedad.

Además del miR-128-3p, la expresión alterada del miR-335-3p y miR-326 ha permitido discriminar entre pacientes con EMR positiva y EMR negativa un año después del tratamiento, con valores de AUC de 0.80 y 0.85, respectivamente (28,30). Ambos microRNAs mostraron una expresión disminuida en muestras de médula ósea de pacientes con EMR positiva en comparación con pacientes con EMR negativa. En el caso del miR-326, también se reveló que un nivel de expresión por debajo del punto de corte (0.08) confería un riesgo 4.8 veces mayor de resistencia a la quimioterapia ($p = 0.023$).

Los valores de AUC observados en estos estudios previos fueron superiores a los observados en el presente estudio para los microRNAs con mejor capacidad discriminativa (miR-223-3p solo: AUC = 0.71, combinación con miR-1290 y miR-1246 : AUC = 0.72). Asimismo, ninguno de los microRNAs reportados previamente como biomarcadores potenciales del estado de EMR (miR-128-3p, miR-335-3p y miR-326) pudo identificarse en este estudio, probablemente debido a la diferencia en las muestras biológicas utilizadas, el estadio de la enfermedad evaluado y los grupos de comparación establecidos.

Como se mencionó anteriormente, estudios previos han demostrado que los patrones de secreción de microRNAs varían según el tipo de muestra analizada. Qian *et al.* y Hoshino

et al. demostraron que los pacientes con cáncer gástrico y carcinoma de células escamosas de esófago presentaron niveles significativamente más altos de expresión del miR-1246 en orina en comparación con los controles sanos. Sin embargo, esta expresión alterada no se observó en tejidos cancerosos ni en saliva de pacientes con cáncer gástrico y carcinoma de células escamosas de esófago, respectivamente (130,131).

A diferencia de la sangre, la producción de saliva y orina puede fluctuar significativamente a lo largo del día, en función de diversos factores como la edad, el sexo, el ritmo circadiano, la dieta, la medicación y la exposición ambiental, que, a su vez, pueden tener un impacto en la expresión de los microRNAs presentes en estos fluidos (131). Además, aspectos técnicos como el estabilizador de RNA añadido a la muestra, el método de recolección de la muestra y el software utilizado para el alineamiento de secuencias durante el análisis bioinformático también pueden influir en los niveles de microRNAs detectados en estos fluidos (110). Todos estos factores explicarían las discrepancias observadas entre los resultados obtenidos en este estudio respecto a estudios previos realizados en pacientes con LLA.

Un aspecto adicional relevante para la interpretación de los hallazgos obtenidos en este estudio es la discrepancia en el patrón de expresión del miR-1246 y miR-1290 entre la fase exploratoria (sobreexpresión) y la fase de validación clínica (subexpresión), lo que se debería a las diferencias en las características clínicas de la muestra de pacientes utilizada. Dado que el grupo de pacientes utilizado en cada fase fue diferente, los perfiles genéticos también difirieron entre los pacientes. Sin embargo, aunque los pacientes incluidos en cada fase tuvieron perfiles genéticos distintos, el miR-223-3p mantuvo el patrón de sobreexpresión en ambos grupos, lo que reafirma su papel potencial como biomarcador de ERM en LLA.

A pesar de los resultados prometedores obtenidos, el presente estudio tuvo varias limitaciones. Los resultados obtenidos en la fase exploratoria y la fase de validación clínica se basan en un tamaño de muestra pequeño; por lo tanto, deben confirmarse en una población con mayor número de pacientes para garantizar una mayor precisión de los hallazgos con respecto a la identificación de secuencias significativamente desreguladas y su capacidad discriminativa. También es importante considerar que el desempeño de los modelos de regresión utilizados para construir las curvas ROC puede verse influenciado por otras variables sociodemográficas y clínicas; por lo que se sugiere que futuros estudios en poblaciones más grandes incluyan estos factores en los modelos de regresión que se formulen a fin de obtener datos más robustos sobre el valor diagnóstico, pronóstico o de respuesta al tratamiento de los microRNAs.

Además, es necesario mejorar el protocolo de aislamiento de microRNAs a partir de muestras de orina a fin de capturar una población representativa de microRNAs; lo que ayudaría a obtener resultados preliminares sólidos utilizando sRNA-Seq que pueden validarse mediante RT-qPCR. En este caso, se decidió no incluir las muestras de orina en la fase de validación debido a la concentración limitada de microRNAs aislados a partir de este fluido (<1 ng/ μ l), lo que podría haber influido en la identificación de sólo dos secuencias expresadas diferencialmente entre pacientes con un riesgo alto de recaída y pacientes con un riesgo estándar-intermedio de recaída. En general, se ha observado que es posible obtener una concentración de RNA total aproximada de 6.6 ng/ μ l a partir de un volumen de orina de 30 ml en individuos sanos (98). Sin embargo, dado que los microRNAs representan aproximadamente el 0.01% del RNA total, la concentración aproximada de microRNAs en 30 ml de orina equivaldría a 0.001 ng/ μ l. A pesar de las limitadas cantidades de microRNAs

presentes en este fluido, diversos estudios han demostrado la detección de una cantidad considerable de microRNAs expresados diferencialmente entre pacientes con tumores sólidos e individuos sanos mediante secuenciación empleando volúmenes de orina de 1 ml o menores (desde 12 hasta 98 secuencias) (145–149). En este sentido, resultaría fundamental ampliar el número de muestras analizadas mediante secuenciación para corroborar el patrón de expresión observado en orina, y adicionalmente, evaluar el uso de volúmenes de muestra más grandes, para descartar la influencia del volumen de muestra en el rendimiento del secuenciación.

Aunque los microRNAs circulantes han sido ampliamente estudiados como potenciales biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y respuesta al tratamiento en cáncer, hasta la fecha el análisis de la expresión de estas secuencias no se ha implementado en la rutina clínica debido a factores preanalíticos y analíticos que influyen en la obtención de resultados comparables entre laboratorios, asociados con los métodos utilizados para la recolección y procesamiento de muestras, la detección molecular de los microRNAs, y el análisis de datos de las pruebas moleculares (150).

La potencial validación de estas secuencias para su aplicación en la rutina clínica como biomarcadores para la medición de EMR en LLA pediátrica en el futuro, podría contribuir a reducir la carga de ansiedad y estrés asociado al procedimiento de recolección de aspirados de médula ósea, además de eliminar la necesidad de contar con infraestructura y personal capacitado para la obtención de este tipo de muestra y ayunar previo al procedimiento.

Como potenciales objetivos de futuros estudios, se sugiere evaluar el valor diagnóstico de los microRNA salivales validados en el presente estudio con la finalidad de sustituir el uso

de aspirados de médula ósea durante el diagnóstico de leucemia en niños (15). Además, se recomienda evaluar la utilidad de estos microRNA para medir la EMR en otros puntos de control relevantes durante la quimioterapia, de acuerdo al protocolo de tratamiento utilizado. Adicionalmente, se sugiere proponer algoritmos basados en la expresión de microRNAs y otros signos y síntomas clínicos relevantes para el diagnóstico de la enfermedad o medición de la EMR.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que el miR-223-3p, solo o en combinación con miR-1246 y miR-1290, podría representar un potencial biomarcador no invasivo de EMR en la LLA pediátrica.

7. CONCLUSIONES

- Durante la fase exploratoria, se identificaron 30 microRNAs expresados diferencialmente entre el grupo de riesgo alto y el grupo de riesgo estándar-intermedio, en saliva, y dos en orina.
- El miR-1246, miR-1290 y miR-223-3p presentaron los niveles más altos de sobreexpresión en saliva, mientras que miR-3650, miR-4740-3p y miR-4713-3p, los niveles más altos de subexpresión.
- Los dos microRNAs expresados diferencialmente en orina estuvieron subexpresados.
- Durante la fase de validación técnica, se confirmó el patrón de sobreexpresión del miR-1246, miR-1290 y miR-223-3p en el grupo de riesgo alto en comparación con el grupo de riesgo estándar-intermedio.
- Durante la fase de validación clínica, fue evidente que el miR-223-3p estaba sobreexpresado en pacientes del grupo de riesgo alto en comparación con los pacientes del grupo de riesgo estándar-intermedio.
- El uso del miR-223-3p solo y la combinación miR-223-3p, miR-1290 y miR-1246 permitió discriminar entre pacientes del grupo de riesgo alto y pacientes del grupo de riesgo estándar-intermedio.

8. RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar hisopos diseñados específicamente para la recolección de saliva en niños, con el fin de mejorar la aceptación del método por parte del paciente (especialmente en infantes) y obtener una cantidad suficiente de muestra para su posterior análisis.
- Se recomienda realizar ensayos comparativos utilizando diferentes volúmenes de orina para el aislamiento de microRNAs para descartar la influencia del volumen de muestra en el desempeño de sRNA-Seq, y por tanto, en la identificación de candidatos expresados diferencialmente.
- Se recomienda validar los resultados obtenidos en el presente estudio en cohortes que incluyan un mayor número de pacientes para corroborar la utilidad del miR-223-3p solo o en combinación con el miR-1290 y miR-1246 como biomarcador no invasivo de EMR en el día 15 de quimioterapia. Debido a que el análisis individual de un único microRNA mediante RT-qPCR presenta mayor viabilidad de aplicación en la rutina clínica debido a un menor costo y complejidad en comparación con el análisis de los 3 microRNAs, se recomienda centrar futuras validaciones en el análisis individual del miR-223-3p.
- Se recomienda considerar futuros estudios que permitan evaluar la utilidad de los microRNAs secretados en saliva como biomarcadores diagnósticos de LLA o biomarcadores de EMR en otros puntos de tiempo de la quimioterapia.
- Se recomienda explorar los potenciales blancos de los miRNAs estudiados y las vías de señalización involucradas empleando programas bioinformáticos en línea como Targetscan, miRanda, miRmap, entre otros, en futuros estudios. Conocer los potenciales blancos de los miRNAs estudiados permitiría comprender mejor el

mecanismo biológico bajo el cual actúan los microRNAs, esclarecer su rol en la promoción de la progresión de la LLA, e identificar potenciales blancos para la aplicación de terapias dirigidas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 30 de junio de 2017;7(6):e577.
2. Siegel DA, Henley SJ, Li J, Pollack LA, Van Dyne EA, White A. Rates and Trends of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia - United States, 2001-2014. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 15 de septiembre de 2017;66(36):950-4.
3. Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Registro de cáncer de Lima Metropolitana: incidencia y mortalidad 2013-2015 [Internet]. Lima: Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas; 2021 p. 173. Report No.: 6. Disponible en: <https://portal.inen.sld.pe/wp-content/uploads/2022/01/REGISTRO-DE-CANCER-DE-LIMA-METROPOLITANA-2013-2015.pdf>
4. Pui CH, Yang JJ, Bhakta N, Rodriguez-Galindo C. Global efforts toward the cure of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Child Adolesc Health.* junio de 2018;2(6):440-54.
5. Cooper SL, Brown PA. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am.* febrero de 2015;62(1):61-73.
6. Oskarsson T, Söderhäll S, Arvidson J, Forestier E, Frandsen TL, Hellebostad M, et al. Treatment-related mortality in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* abril de 2018;65(4).
7. Health Quality Ontario. Minimal Residual Disease Evaluation in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Clinical Evidence Review. *Ont Health Technol Assess Ser.* 2016;16(7):1-52.
8. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood.* 15 de junio de 2008;111(12):5477-85.
9. Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1 de julio de 2002;100(1):52-8.
10. Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grümayer R, van der Velden V, Fischer S, et al. Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* abril de 2008;22(4):771-82.
11. Zhou J, Goldwasser MA, Li A, Dahlberg SE, Neuberg D, Wang H, et al. Quantitative analysis of minimal residual disease predicts relapse in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia in DFCI ALL Consortium Protocol 95-01. *Blood.* 1 de septiembre de 2007;110(5):1607-11.

12. Della Starza I, Chiaretti S, De Propriis MS, Elia L, Cavalli M, De Novi LA, et al. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: Technical and Clinical Advances. *Front Oncol* [Internet]. 7 de agosto de 2019 [citado 18 de mayo de 2021];9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6692455/>
13. Kruse A, Abdel-Azim N, Kim HN, Ruan Y, Phan V, Ogana H, et al. Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*. 5 de febrero de 2020;21(3):E1054.
14. van der Velden VHJ, Jacobs DCH, Wijkhuijs AJM, Comans-Bitter WM, Willemse MJ, Hähnen K, et al. Minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood are comparable in children with T cell acute lymphoblastic leukemia (ALL), but not in precursor-B-ALL. *Leukemia*. agosto de 2002;16(8):1432-6.
15. Wang Y, Liu Q, Yu JN, Wang HX, Gao LL, Dai YL, et al. Perceptions of parents and paediatricians on pain induced by bone marrow aspiration and lumbar puncture among children with acute leukaemia: a qualitative study in China. *BMJ Open*. 1 de septiembre de 2017;7(9):e015727.
16. Roberts KG, Mullighan CG. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nat Rev Clin Oncol*. junio de 2015;12(6):344-57.
17. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. noviembre de 2010;56(11):1733-41.
18. Rzepiel A, Kutszegi N, Gézsi A, Sági JC, Egyed B, Péter G, et al. Circulating microRNAs as minimal residual disease biomarkers in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Transl Med*. 14 de noviembre de 2019;17(1):372.
19. Rzepiel A, Horváth A, Kutszegi N, Gézsi A, Sági JC, Almási L, et al. MiR-128-3p as blood based liquid biopsy biomarker in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Mol Cell Probes*. 1 de febrero de 2023;67:101893.
20. Zhou K, Liu M, Cao Y. New Insight into microRNA Functions in Cancer: Oncogene–microRNA–Tumor Suppressor Gene Network. *Front Mol Biosci* [Internet]. 7 de julio de 2017 [citado 18 de mayo de 2021];4. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5500619/>
21. Grobbelaar C, Ford AM. The Role of MicroRNA in Paediatric Acute Lymphoblastic Leukaemia: Challenges for Diagnosis and Therapy. *J Oncol*. 13 de octubre de 2019;2019:e8941471.
22. Lu H, Ding Y, Dong Y, Luo X, Wang X, Xiu B, et al. MicroRNA-181b-5p insufficiency predicts treatment response failure risk and unfavorable event-free survival as well as overall survival in acute myeloid leukemia patients. *Oncol Lett*. octubre de 2022;24(4):330.
23. Zhang B, Pei Z, Wang H, Bai J, Wang J, Zhao Y, et al. Clinical Value of Serum miRNA in Patients with Acute Promyelocytic Leukemia. *J Oncol*. 2022;2022:7315879.

24. Bagheri M, Khansarinejad B, Mosayebi G, Moradabadi A, Mondanizadeh M. Diagnostic Value of Plasma miR-145 and miR-185 as Targeting of the APRIL Oncogene in the B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. enero de 2021;22(1):111-7.
25. Chen N, Meng Z, Song J, Kong L, Zhang Y, Guo S, et al. miR-506 in patients with chronic myeloid leukemia and its effect on apoptosis of K562 cells. *Am J Transl Res*. 15 de agosto de 2021;13(8):9413-20.
26. Swellam M, Hashim M, Mahmoud MS, Ramadan A, Hassan NM. Aberrant Expression of Some Circulating miRNAs in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Biochem Genet*. agosto de 2018;56(4):283-94.
27. Zhang Y, Li X, Bai L, Li L, Li D, Ding X, et al. MicroRNA-31 is a potential biomarker for screening B-lymphoblastic leukemia in children. *Oncol Lett*. noviembre de 2019;18(5):4930-5.
28. Ghodousi ES, Rahgozar S. MicroRNA-326 and microRNA-200c: Two novel biomarkers for diagnosis and prognosis of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Cell Biochem*. julio de 2018;119(7):6024-32.
29. Kovynev IB, Titov SE, Ruzankin PS, Agakishiev MM, Veryaskina YA, Nedel'ko VM, et al. Profiling 25 Bone Marrow microRNAs in Acute Leukemias and Secondary Nonleukemic Hematopoietic Conditions. *Biomedicines*. 14 de diciembre de 2020;8(12):607.
30. Pouyanrad S, Rahgozar S, Ghodousi ES. Dysregulation of miR-335-3p, targeted by NEAT1 and MALAT1 long non-coding RNAs, is associated with poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Gene*. 15 de abril de 2019;692:35-43.
31. Chu X, Wu D, Zhang C, Hu S. Expression pattern of miR-16-2-3p and its prognostic values on pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Scand J Clin Lab Invest*. julio de 2023;83(4):207-11.
32. Cheng AJ, You GR, Lee CJ, Lu YC, Tang SJ, Huang YF, et al. Systemic Investigation Identifying Salivary miR-196b as a Promising Biomarker for Early Detection of Head-Neck Cancer and Oral Precancer Lesions. *Diagn Basel Switz*. 4 de agosto de 2021;11(8):1411.
33. Koopaie M, Manifar S, Talebi MM, Kolahdooz S, Razavi AE, Davoudi M, et al. Assessment of salivary miRNA, clinical, and demographic characterization in colorectal cancer diagnosis. *Transl Oncol*. marzo de 2024;41:101880.
34. Aftab M, Poojary SS, Seshan V, Kumar S, Agarwal P, Tandon S, et al. Urine miRNA signature as a potential non-invasive diagnostic and prognostic biomarker in cervical cancer. *Sci Rep*. 14 de mayo de 2021;11(1):10323.
35. Hirschfeld M, Rücker G, Weiß D, Berner K, Ritter A, Jäger M, et al. Urinary Exosomal MicroRNAs as Potential Non-invasive Biomarkers in Breast Cancer Detection. *Mol Diagn Ther*. abril de 2020;24(2):215-32.
36. Korrapolu RSA, Boddu D, John R, Antonisamy N, Geevar T, Arunachalam AK, et al. What happens to children with acute lymphoblastic leukemia in low- and middle-income countries after relapse? A single-center experience from India. *Pediatr Hematol Oncol*. 2023;40(5):475-84.

37. Campana D, Pui CH. Minimal residual disease–guided therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 6 de abril de 2017;129(14):1913-8.
38. Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E, Dolman G, Neoh SH, Peng LM, et al. Monitoring minimal residual disease in peripheral blood in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. noviembre de 1997;99(2):314-9.
39. Kotrova M, Volland A, Kehden B, Trautmann H, Ritgen M, Wäsch R, et al. Comparison of minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. abril de 2020;34(4):1154-7.
40. Zernikow B, Meyerhoff U, Michel E, Wiesel T, Hasan C, Janssen G, et al. Pain in pediatric oncology--children's and parents' perspectives. *Eur J Pain Lond Engl*. agosto de 2005;9(4):395-406.
41. Bain BJ. Bone marrow biopsy morbidity: review of 2003. *J Clin Pathol*. abril de 2005;58(4):406-8.
42. Caes L, Vervoort T, Devos P, Verlooy J, Benoit Y, Goubert L. Parental distress and catastrophic thoughts about child pain: implications for parental protective behavior in the context of child leukemia-related medical procedures. *Clin J Pain*. septiembre de 2014;30(9):787-99.
43. Bailey LC, Lange BJ, Rheingold SR, Bunin NJ. Bone-marrow relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol*. septiembre de 2008;9(9):873-83.
44. Forero-Castro M, Montaña A, Robledo C, Coca AG de, Fuster JL, Heras N de las, et al. Integrated Genomic Analysis of Chromosomal Alterations and Mutations in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Reveals Distinct Genetic Profiles at Relapse. *Diagnostics [Internet]*. julio de 2020 [citado 27 de marzo de 2024];10(7). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7400270/>
45. Lindqvist CM, Lundmark A, Nordlund J, Freyhult E, Ekman D, Almlöf JC, et al. Deep targeted sequencing in pediatric acute lymphoblastic leukemia unveils distinct mutational patterns between genetic subtypes and novel relapse-associated genes. *Oncotarget*. 9 de septiembre de 2016;7(39):64071.
46. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 3 de diciembre de 1993;75(5):843-54.
47. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 3 de diciembre de 1993;75(5):855-62.
48. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 de noviembre de 2002;99(24):15524-9.
49. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2 de marzo de 2004;101(9):2999-3004.

50. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* mayo de 2008;141(5):672-5.
51. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci.* 29 de julio de 2008;105(30):10513-8.
52. Mansouri S, Khansarinejad B, Mosayebi G, Eghbali A, Mondanizadeh M. Alteration in Expression of miR-32 and FBXW7 Tumor Suppressor in Plasma Samples of Patients with T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Manag Res.* 18 de febrero de 2020;12:1253-9.
53. Memari F, Tavakolpour V, Mohajeri N, Poopak B, Fallah P, Alizadeh E, et al. Distinct power of bone marrow microRNA signatures and tumor suppressor genes for early detection of acute leukemia. *Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex.* julio de 2022;24(7):1372-80.
54. Hosseinpour-Soleimani F, Khamisipour G, Derakhshan Z, Ahmadi B. Expression analysis of circulating miR-22, miR-122, miR-217 and miR-367 as promising biomarkers of acute lymphoblastic leukemia. *Mol Biol Rep.* enero de 2023;50(1):255-65.
55. Glinge C, Clauss S, Boddum K, Jabbari R, Jabbari J, Risgaard B, et al. Stability of Circulating Blood-Based MicroRNAs – Pre-Analytic Methodological Considerations. *PLoS ONE.* 2 de febrero de 2017;12(2):e0167969.
56. Ishikawa H, Yamada H, Taromaru N, Kondo K, Nagura A, Yamazaki M, et al. Stability of serum high-density lipoprotein-microRNAs for preanalytical conditions. *Ann Clin Biochem.* enero de 2017;54(1):134-42.
57. Sohel MH. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. *Achiev Life Sci.* 1 de diciembre de 2016;10(2):175-86.
58. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med.* noviembre de 2008;14(11):1271-7.
59. Hashimoto Y, Akiyama Y, Yuasa Y. Multiple-to-multiple relationships between microRNAs and target genes in gastric cancer. *PLoS One.* 2013;8(5):e62589.
60. Lee SHR, Li Z, Tai ST, Oh BLZ, Yeoh AEJ. Genetic Alterations in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Interactions with Clinical Features and Treatment Response. *Cancers.* 12 de agosto de 2021;13(16):4068.
61. Nabhan M, Louka ML, Khairy E, Tash F, Ali-Labib R, El-Habashy S. MicroRNA-181a and its target Smad 7 as potential biomarkers for tracking child acute lymphoblastic leukemia. *Gene.* 10 de septiembre de 2017;628:253-8.
62. Yang YL, Yen CT, Pai CH, Chen HY, Yu SL, Lin CY, et al. A Double Negative Loop Comprising ETV6/RUNX1 and MIR181A1 Contributes to Differentiation Block in t(12;21)-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS ONE.* 18 de noviembre de 2015;10(11):e0142863.

63. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. Global Cancer Observatory: Cancer Today [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2020 [citado 8 de noviembre de 2023]. Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/home>
64. Castro-Arechaga S, Ronceros-Salas L, Vega-Centeno S, Moreno M, Soto A. Sobrevida global y libre de enfermedad en una cohorte peruana de pacientes con leucemia linfoblástica aguda. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. julio de 2018;35(3):416-24.
65. Seibel NL, Steinherz PG, Sather HN, Nachman JB, DeLaat C, Ettinger LJ, et al. Early postinduction intensification therapy improves survival for children and adolescents with high-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood*. 1 de marzo de 2008;111(5):2548-55.
66. Zawitkowska J, Lejman M, Romiszewski M, Matysiak M, Ćwiklińska M, Balwierz W, et al. Results of two consecutive treatment protocols in Polish children with acute lymphoblastic leukemia. *Sci Rep*. 19 de noviembre de 2020;10:20168.
67. Pawinska-Wasikowska K, Bukowska-Strakova K, Surman M, Rygielska M, Sadowska B, Ksiazek T, et al. Go with the Flow-Early Assessment of Measurable Residual Disease in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia Treated According to ALL IC-BFM2009. *Cancers*. 30 de octubre de 2022;14(21):5359.
68. Harrison CJ. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. enero de 2009;144(2):147-56.
69. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, et al. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1 de octubre de 2002;100(7):2399-402.
70. Roberts KG. Genetics and prognosis of ALL in children vs adults. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 30 de noviembre de 2018;2018(1):137-45.
71. Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 10 de septiembre de 2020;105(11):2524-39.
72. Tran TH, Hunger SP. The genomic landscape of pediatric acute lymphoblastic leukemia and precision medicine opportunities. *Semin Cancer Biol*. septiembre de 2022;84:144-52.
73. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol [Internet]*. 2018 [citado 3 de junio de 2021];9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2018.00402/full>
74. Johanson TM, Skinner JPJ, Kumar A, Zhan Y, Lew AM, Chong MMW. The role of microRNAs in lymphopoiesis. *Int J Hematol*. 1 de septiembre de 2014;100(3):246-53.
75. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*. febrero de 2010;10(2):111-22.
76. Slavov SN, Gimenes Teixeira HL, Rego EM. The role of micro-ribonucleic acids in normal hematopoiesis and leukemic T-lymphogenesis. *Braz J Med Biol Res*. julio de 2010;43:619-26.

77. Luan C, Yang Z, Chen B. The functional role of microRNA in acute lymphoblastic leukemia: relevance for diagnosis, differential diagnosis, prognosis, and therapy. *OncoTargets Ther.* 13 de octubre de 2015;8:2903-14.
78. Havelange V, Garzon R. MicroRNAs: Emerging key regulators of hematopoiesis. *Am J Hematol.* 2010;85(12):935-42.
79. He Y, Jiang X, Chen J. The role of miR-150 in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene.* julio de 2014;33(30):3887-93.
80. Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, et al. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell.* 5 de octubre de 2007;131(1):146-59.
81. Zhou B, Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci.* 24 de abril de 2007;104(17):7080-5.
82. Ghisi M, Corradin A, Basso K, Frasson C, Serafin V, Mukherjee S, et al. Modulation of microRNA expression in human T-cell development: targeting of NOTCH3 by miR-150. *Blood.* 30 de junio de 2011;117(26):7053-62.
83. Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ, et al. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell.* 7 de marzo de 2008;132(5):875-86.
84. Banerjee A, Schambach F, DeJong CS, Hammond SM, Reiner SL. Micro-RNA-155 inhibits IFN-gamma signaling in CD4+ T cells. *Eur J Immunol.* enero de 2010;40(1):225-31.
85. Seddiki N, Brezar V, Ruffin N, Lévy Y, Swaminathan S. Role of miR-155 in the regulation of lymphocyte immune function and disease. *Immunology.* mayo de 2014;142(1):32-8.
86. Thai TH, Calado DP, Casola S, Ansel KM, Xiao C, Xue Y, et al. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science.* 27 de abril de 2007;316(5824):604-8.
87. Lu D, Nakagawa R, Lazzaro S, Staudacher P, Abreu-Goodger C, Henley T, et al. The miR-155–PU.1 axis acts on Pax5 to enable efficient terminal B cell differentiation. *J Exp Med.* 20 de octubre de 2014;211(11):2183-98.
88. Li QJ, Chau J, Ebert PJR, Sylvester G, Min H, Liu G, et al. miR-181a Is an Intrinsic Modulator of T Cell Sensitivity and Selection. *Cell.* 6 de abril de 2007;129(1):147-61.
89. Neilson JR, Zheng GXY, Burge CB, Sharp PA. Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. *Genes Dev.* 1 de marzo de 2007;21(5):578-89.
90. Verduci L, Azzalin G, Gioiosa S, Carissimi C, Laudadio I, Fulci V, et al. microRNA-181a enhances cell proliferation in acute lymphoblastic leukemia by targeting EGR1. *Leuk Res.* abril de 2015;39(4):479-85.
91. de Carvalho INSR, de Freitas RM, Vargas FR. Translating microRNAs into biomarkers: What is new for pediatric cancer? *Med Oncol Northwood Lond Engl.* mayo de 2016;33(5):49.

92. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* junio de 2007;9(6):654-9.
93. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci.* 22 de marzo de 2011;108(12):5003-8.
94. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol.* abril de 2011;13(4):423-33.
95. Yamada N, Tsujimura N, Kumazaki M, Shinohara H, Taniguchi K, Nakagawa Y, et al. Colorectal cancer cell-derived microvesicles containing microRNA-1246 promote angiogenesis by activating Smad 1/5/8 signaling elicited by PML down-regulation in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* noviembre de 2014;1839(11):1256-72.
96. Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31 de julio de 2012;109(31):E2110-2116.
97. Melo SA, Sugimoto H, O'Connell JT, Kato N, Villanueva A, Vidal A, et al. Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell.* 10 de noviembre de 2014;26(5):707-21.
98. El-Mogy M, Lam B, Haj-Ahmad TA, McGowan S, Yu D, Nosal L, et al. Diversity and signature of small RNA in different bodily fluids using next generation sequencing. *BMC Genomics.* 29 de mayo de 2018;19(1):408.
99. Riches A, Campbell E, Borger E, Powis S. Regulation of exosome release from mammary epithelial and breast cancer cells - a new regulatory pathway. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. marzo de 2014;50(5):1025-34.
100. Radu LE, Colita A, Pasca S, Tomuleasa C, Popa C, Serban C, et al. Day 15 and Day 33 Minimal Residual Disease Assessment for Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Treated According to the BFM ALL IC 2009 Protocol: Single-Center Experience of 133 Cases. *Front Oncol.* 2020;10:923.
101. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, Dworzak MN, Ratei R, Silvestri D, et al. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 de noviembre de 2009;27(31):5168-74.
102. Rojas Soto N, Moreno Larrea M, Pizarro Perea M, Aranda Gomero L, Arteta Altamirano C, Eyzaguirre Zapata R, et al. Guía de Práctica Clínica para el manejo de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda en el Seguro Social del Perú (EsSalud). *Acta Médica Peru.* enero de 2021;38(1):64-78.
103. Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja. Guía de Práctica Clínica de Leucemia Linfoblástica Aguda [Internet]. Lima: Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja; 2016 sep p. 74. Disponible en: [file:///Users/Alejandra/Downloads/RD-133-2016%20\(2\).pdf](file:///Users/Alejandra/Downloads/RD-133-2016%20(2).pdf)

104. Hart SN, Therneau TM, Zhang Y, Poland GA, Kocher JP. Calculating Sample Size Estimates for RNA Sequencing Data. *J Comput Biol.* diciembre de 2013;20(12):970-8.
105. Matlock B. Assessment of Nucleic Acid Purity [Internet]. Thermo Scientific; 2015. Disponible en: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>
106. Mjelle R, Sellæg K, Sætrom P, Thommesen L, Sjursen W, Hofslie E. Identification of metastasis-associated microRNAs in serum from rectal cancer patients. *Oncotarget.* 27 de octubre de 2017;8(52):90077-89.
107. Davis MPA, van Dongen S, Abreu-Goodger C, Bartonicek N, Enright AJ. Kraken: a set of tools for quality control and analysis of high-throughput sequence data. *Methods San Diego Calif.* 1 de septiembre de 2013;63(1):41-9.
108. Sampathkumar NK, Sundaram VK, Danthi PS, Barakat R, Solomon S, Mondal M, et al. RNA-Seq is not required to determine stable reference genes for qPCR normalization. *PLoS Comput Biol.* febrero de 2022;18(2):e1009868.
109. Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol.* 31 de enero de 2012;
110. Sullivan R, Montgomery A, Scipioni A, Jhaveri P, Schmidt AT, Hicks SD. Confounding Factors Impacting microRNA Expression in Human Saliva: Methodological and Biological Considerations. *Genes.* 16 de octubre de 2022;13(10):1874.
111. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 18 de junio de 2002;3(7):RESEARCH0034.
112. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif.* diciembre de 2001;25(4):402-8.
113. Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 27 de octubre de 2010;11(10):R106.
114. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol.* 2009;10(6):R64.
115. Xie B, Li L, Zhang Z, Zhao L, Cheng J, Zhou C, et al. MicroRNA-1246 by Targeting AXIN2 and GSK-3 β Overcomes Drug Resistance and Induces Apoptosis in Chemo-resistant Leukemia Cells. *J Cancer.* 13 de mayo de 2021;12(14):4196-208.
116. Xie B, Zhao L, Zhang Z, Zhou C, Tian Y, Kang Y, et al. CADM1 impairs the effect of miR-1246 on promoting cell cycle progression in chemo-resistant leukemia cells. *BMC Cancer.* 9 de octubre de 2023;23(1):955.

117. Abdelhamed S, Butler JT, Jung S, Chen DW, Jenkins G, Gao L, et al. Rational biomarker development for the early and minimally invasive monitoring of AML. *Blood Adv.* 9 de noviembre de 2021;5(21):4515-20.
118. Hornick NI, Huan J, Doron B, Goloviznina NA, Lapidus J, Chang BH, et al. Serum Exosome MicroRNA as a Minimally-Invasive Early Biomarker of AML. *Sci Rep.* 12 de junio de 2015;5:11295.
119. Chen L, Guo Z, Zhou Y, Ni J, Zhu J, Fan X, et al. microRNA-1246-containing extracellular vesicles from acute myeloid leukemia cells promote the survival of leukemia stem cells via the LRIG1-mediated STAT3 pathway. *Aging.* 23 de abril de 2021;13(10):13644-62.
120. Luo M, Zhang Q, Xia M, Hu F, Ma Z, Chen Z, et al. Differential Co-expression and Regulatory Network Analysis Uncover the Relapse Factor and Mechanism of T Cell Acute Leukemia. *Mol Ther Nucleic Acids.* 7 de septiembre de 2018;12:184-94.
121. Zhou W, Wang S, Ying Y, Zhou R, Mao P. miR-196b/miR-1290 participate in the antitumor effect of resveratrol via regulation of IGFBP3 expression in acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Rep.* febrero de 2017;37(2):1075-83.
122. HERNANDEZ-GONZALEZ O, MILAN-SEGOVIA RDC, ZAVALA-REYES D, ALVARADO-ZAMARRIPA DM, ORTIZ-ZAMUDIO JJ, CORREA-GONZALEZ LC, et al. Altered Arylamine N-acetyltransferase 1 and miR-1290 Levels in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Pilot Study. *In Vivo.* 3 de mayo de 2023;37(3):1129-44.
123. Avigad S, Verly IRN, Lebel A, Kordi O, Shichrur K, Ohali A, et al. miR expression profiling at diagnosis predicts relapse in pediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* abril de 2016;55(4):328-39.
124. Hou Y, Sun J, Huang J, Yao F, Chen X, Zhu B, et al. Circular RNA circRNA_0000094 sponges microRNA-223-3p and up-regulate F-box and WD repeat domain containing 7 to restrain T cell acute lymphoblastic leukemia progression. *Hum Cell.* mayo de 2021;34(3):977-89.
125. Barbagallo D, Ponti D, Bassani B, Bruno A, Pulze L, Akkihal SA, et al. MiR-223-3p in Cancer Development and Cancer Drug Resistance: Same Coin, Different Faces. *Int J Mol Sci.* 26 de julio de 2024;25(15):8191.
126. Braun T, Glass M, Wahnschaffe L, Otte M, Mayer P, Franitza M, et al. Micro-RNA networks in T-cell prolymphocytic leukemia reflect T-cell activation and shape DNA damage response and survival pathways. *Haematologica.* 1 de enero de 2022;107(1):187-200.
127. Yu G, Yin Z, He H, Zheng Z, Chai Y, Xuan L, et al. Low serum miR-223 expression predicts poor outcome in patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Lab Anal.* 6 de noviembre de 2019;34(3):e23096.
128. Xu Y, Qin S, An T, Tang Y, Huang Y, Zheng L. MiR-145 detection in urinary extracellular vesicles increase diagnostic efficiency of prostate cancer based on hydrostatic filtration dialysis method. *The Prostate.* julio de 2017;77(10):1167-75.

129. Ramirez-Garrastacho M, Berge V, Linē A, Llorente A. Potential of miRNAs in urinary extracellular vesicles for management of active surveillance in prostate cancer patients. *Br J Cancer*. febrero de 2022;126(3):492-501.
130. Qian X, Xie F, Wei H, Cui D. Identification of Key Circulating Exosomal microRNAs in Gastric Cancer. *Front Oncol*. 16 de julio de 2021;11:693360.
131. Hoshino I, Ishige F, Iwatate Y, Gunji H, Kuwayama N, Nabeya Y, et al. Cell-free microRNA-1246 in different body fluids as a diagnostic biomarker for esophageal squamous cell carcinoma. *PLOS ONE*. 10 de marzo de 2021;16(3):e0248016.
132. Machida T, Tomofuji T, Maruyama T, Yoneda T, Ekuni D, Azuma T, et al. miR-1246 and miR-4644 in salivary exosome as potential biomarkers for pancreatobiliary tract cancer. *Oncol Rep*. octubre de 2016;36(4):2375-81.
133. Puhka M, Thierens L, Nicorici D, Forsman T, Mirtti T, Af Hällström T, et al. Exploration of Extracellular Vesicle miRNAs, Targeted mRNAs and Pathways in Prostate Cancer: Relation to Disease Status and Progression. *Cancers*. 21 de enero de 2022;14(3):532.
134. Zhou K, Wei Y, Li X, Yang X. MiR-223-3p targets FOXO3a to inhibit radiosensitivity in prostate cancer by activating glycolysis. *Life Sci*. 1 de octubre de 2021;282:119798.
135. Kyriakidis I, Kyriakidis K, Tsezou A. MicroRNAs and the Diagnosis of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Systematic Review, Meta-Analysis and Re-Analysis with Novel Small RNA-Seq Tools. *Cancers*. 17 de agosto de 2022;14(16):3976.
136. Zhao T, Meng W, Chin Y, Gao L, Yang X, Sun S, et al. Identification of miR-25-3p as a tumor biomarker: Regulation of cellular functions via TOB1 in breast cancer. *Mol Med Rep*. junio de 2021;23(6):406.
137. Zou X, Gao F, Wang ZY, Zhang H, Liu QX, Jiang L, et al. A three-microRNA panel in serum as novel biomarker for papillary thyroid carcinoma diagnosis. *Chin Med J (Engl)*. 5 de noviembre de 2020;133(21):2543-51.
138. Zou X, Xia T, Li M, Wang T, Liu P, Zhou X, et al. MicroRNA profiling in serum: Potential signatures for breast cancer diagnosis. *Cancer Biomark Sect Dis Markers*. 2021;30(1):41-53.
139. Kumar S, Sharawat SK, Ali A, Gaur V, Malik PS, Kumar S, et al. Identification of differentially expressed circulating serum microRNA for the diagnosis and prognosis of Indian non-small cell lung cancer patients. *Curr Probl Cancer*. agosto de 2020;44(4):100540.
140. Zou X, Wei J, Huang Z, Zhou X, Lu Z, Zhu W, et al. Identification of a six-miRNA panel in serum benefiting pancreatic cancer diagnosis. *Cancer Med*. 21 de abril de 2019;8(6):2810-22.
141. Boonkaew B, Sathawiwat N, Pinjaroen N, Chuaypen N, Tangkijvanich P. Circulating Extracellular Vesicle-Derived microRNAs as Novel Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Non-Viral-Related Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 7 de noviembre de 2023;24(22):16043.

142. Timofeeva AV, Fedorov IS, Asaturova AV, Sannikova MV, Tregubova AV, Mayboroda OA, et al. Blood Plasma Small Non-Coding RNAs as Diagnostic Molecules for the Progesterone-Receptor-Negative Phenotype of Serous Ovarian Tumors. *Int J Mol Sci.* 30 de julio de 2023;24(15):12214.
143. Silva J, Tavares V, Afonso A, Garcia J, Cerqueira F, Medeiros R. Plasmatic MicroRNAs and Treatment Outcomes of Patients with Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer: A Hospital-Based Cohort Study and In Silico Analysis. *Int J Mol Sci.* 22 de mayo de 2023;24(10):9101.
144. Sromek M, Rymkiewicz G, Paziewska A, Szafron LM, Kulecka M, Zajdel M, et al. A Set of 17 microRNAs Common for Brain and Cerebrospinal Fluid Differentiates Primary Central Nervous System Lymphoma from Non-Malignant Brain Tumors. *Biomolecules.* 21 de septiembre de 2021;11(9):1395.
145. Moisoiu T, Dragomir MP, Iancu SD, Schallenberg S, Birolo G, Ferrero G, et al. Combined miRNA and SERS urine liquid biopsy for the point-of-care diagnosis and molecular stratification of bladder cancer. *Mol Med Camb Mass.* 1 de abril de 2022;28(1):39.
146. Juracek J, Madrzyk M, Trachtova K, Ruckova M, Bohosova J, Barth DA, et al. Combination of Urinary MiR-501 and MiR-335 With Current Clinical Diagnostic Parameters as Potential Predictive Factors of Prostate Biopsy Outcome. *Cancer Genomics Proteomics.* 2023;20(3):308-16.
147. Lin JT, Tsai KW. Circulating miRNAs Act as Diagnostic Biomarkers for Bladder Cancer in Urine. *Int J Mol Sci.* 20 de abril de 2021;22(8):4278.
148. Pardini B, Cordero F, Naccarati A, Viberti C, Birolo G, Oderda M, et al. microRNA profiles in urine by next-generation sequencing can stratify bladder cancer subtypes. *Oncotarget.* 17 de abril de 2018;9(29):20658-69.
149. Du L, Jiang X, Duan W, Wang R, Wang L, Zheng G, et al. Cell-free microRNA expression signatures in urine serve as novel noninvasive biomarkers for diagnosis and recurrence prediction of bladder cancer. *Oncotarget.* 20 de junio de 2017;8(25):40832-42.
150. Tiberio P, Callari M, Angeloni V, Daidone MG, Appierto V. Challenges in using circulating miRNAs as cancer biomarkers. *BioMed Res Int.* 2015;2015:731479.
151. Obuchowski NA, Lieber ML, Wians FH. ROC curves in clinical chemistry: uses, misuses, and possible solutions. *Clin Chem.* julio de 2004;50(7):1118-25.

10. ANEXOS

ANEXO 1: ASENTIMIENTO INFORMADO PARA NIÑOS MENORES DE 12 AÑOS

PARTE I: HOJA DE INFORMACIÓN

Soy del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja y estoy realizando un trabajo de investigación que tiene como objetivo encontrar algunas piezas pequeñas, como las de un rompecabezas, en la orina y la saliva de niños con una enfermedad que se llama leucemia y que afecta a los componentes de la sangre. Para ello, quiero pedirte que nos apoyes. Te hemos elegido porque tu médico ha pedido unas pruebas para saber si tienes esta enfermedad.

Este estudio busca encontrar una forma fácil y no dolorosa para evaluar si el tratamiento que se utiliza para tratar la leucemia está funcionando, utilizando muestras de orina y saliva.

Tu participación en el estudio consistirá en autorizar que tomemos una muestra de saliva y orina. Las muestras serán tomadas en un único momento, ya sea el día de hoy o en el día 15 del tratamiento que te dé tu médico, dependiendo de los resultados de las pruebas que pidió.

La saliva la obtendremos colocando un hisopo de algodón debajo de tu lengua por un ratito; mientras que, la orina, la recolectaremos en un frasquito de plástico. Estos procedimientos tomarán más o menos 5 minutos en total, y no te causarán ningún dolor, aunque puede que te hagan sentir incómodo o impaciente.

No deberás pagar nada por participar en el estudio, tampoco recibirás dinero. De cualquier modo, este estudio ayudará a encontrar una forma fácil y no dolorosa para evaluar si el tratamiento que se utiliza para tratar leucemia está funcionando, sin tener que pinchar a los

niños en sus brazos o en otra parte de su cuerpo.

Tu participación es voluntaria, tú puedes decidir no participar en esta investigación o retirarte del estudio en el momento que tú decidas, sin que cambie la forma en que te atiendan.

Si nos autorizas, las muestras recolectadas podrían ser almacenadas hasta por 5 años en una congeladora para que se sean utilizadas en futuros estudios relacionados a enfermedades que afectan la salud de los niños.

Los resultados que obtengamos en este estudio serán presentados en revistas. Nadie podrá saber tu nombre porque le colocaremos un número a tus muestras y a la hoja en la que anotaremos tu información. No mostraremos tu información o los resultados que obtengamos en el estudio a nadie, y nos aseguraremos de que ninguna persona pueda verlos.

Luego de que recolectemos la muestra de saliva y orina y que anotemos tu información, no volveremos a revisar tu historia clínica o tus informes médicos; tampoco te volveremos a buscar a ti y/o a tu padre.

Si tienes alguna duda al respecto o sientes que tus derechos son vulnerados puedes contactarte con la Dra. Victoria Godoy Vila, al teléfono 952515658 o a su correo electrónico vgodoy@insnsb.gob.pe, con el Comité de Ética del INSN-SB, al teléfono 2300600, anexo 4012, o al correo electrónico comite_etica@insnsb.gob.pe, o con el Presidente del Comité Institucional de Ética de la UPCH, Dr. Luis Saona Ugarte, al teléfono 01-319-0000, anexo 201355.

PARTE II: CERTIFICADO DE ASENTIMIENTO PARA NIÑOS MENORES DE 12

AÑOS

Yo, _____, declaro que he leído y comprendido la hoja que se me ha entregado, y:

- Acepto participar en este estudio.
- No acepto participar en este estudio.

Además:

- Acepto que mis muestras sean almacenadas para futuros estudios.
- No acepto que mis muestras sean almacenadas para futuros estudios.

Persona que proporciona la información

Lugar: _____

Fecha: _____

Nombres y apellidos de la persona que proporciona la información:

Firma de la persona que proporciona la información: _____

Testigo

Lugar: _____

Fecha: _____

Nombres y apellidos del testigo: _____

Firma del testigo: _____

ANEXO 2: ASENTIMIENTO INFORMADO PARA NIÑOS Y ADOLESCENTES ENTRE 12 Y 17 AÑOS

PARTE I: HOJA DE INFORMACIÓN

Instituciones participantes: Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja/ Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Título del proyecto: “MicroRNAs en muestras de orina y saliva como biomarcadores de enfermedad mínima residual en leucemia linfoblástica aguda pediátrica”.

1. Descripción general:

Soy del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja y estoy realizando un trabajo de investigación que tiene como objetivo capturar ciertos elementos microscópicos en la orina y la saliva que están involucrados en el desarrollo de leucemia.

Antes de decidir si quieres participar o no, te rogamos leas detenidamente este documento que incluye la información sobre esta investigación. Puedes formular todas las preguntas que te surjan y solicitar la aclaración sobre cualquier aspecto del mismo.

Tu participación en este estudio es voluntaria. Aunque decidieras no participar, continuarás recibiendo todos los cuidados médicos que pudieses necesitar y la relación con el equipo médico que te atiende no se verá afectada.

2. Propósito del estudio

Las leucemias son un grupo de enfermedades en las que nuestras células sanguíneas no funcionan de manera adecuada a consecuencia de ciertos cambios que ocurren en elementos microscópicos que se encuentran dentro de las células y contienen información importante para poder vivir. El tratamiento de la enfermedad se basa en el uso de fármacos que destruyen las células sanguíneas que no funcionan de manera adecuada. La medición de la eficacia del tratamiento se realiza en muestras de médula ósea o sangre mediante pruebas de laboratorio. Estas muestras se recolectan mediante métodos que ocasionan dolor e incomodidad en el paciente, sobre todo si se trata de niños.

Por este motivo, el objetivo de este estudio es capturar ciertos elementos microscópicos en la orina y saliva, encargados de dirigir o manejar procesos que están asociados con la aparición de leucemia. Esto con el propósito de que, en un futuro, estos elementos puedan ser utilizados como herramientas para el seguimiento de la eficacia del tratamiento contra esta enfermedad, de manera sencilla y sin dolor.

Has sido elegido para ser parte de este estudio debido a que tu médico solicitó análisis clínicos para determinar si tienes leucemia.

3. Procedimientos del estudio

Te estamos solicitando tu autorización para recolectar una muestra de orina y saliva, ya sea el día de hoy o a los 15 días de iniciado el tratamiento que te dé tu médico, dependiendo de los resultados que hayan sido obtenidos en los análisis clínicos.

La recolección de la muestra de saliva será realizada empleando un hisopo de algodón, que será colocado debajo de la lengua durante aproximadamente 60 segundos; mientras que, la recolección de la muestra de orina será realizada empleando un frasco estéril. El volumen de orina y saliva a recolectar será equivalente a aproximadamente una cucharada y media (~20 ml) y una cucharadita (~4 ml), respectivamente. La recolección de ambas muestras tomará aproximadamente 5 minutos.

Las muestras de orina y saliva serán rotuladas con un código numérico y almacenadas en una congeladora a -70°C hasta 5 años después de la toma de muestra, para posteriormente ser eliminadas.

Adicionalmente, se realizará una revisión de tu historia clínica y/o informes médicos a fin de extraer información de tu edad, sexo, lugar de procedencia y datos clínicos.

4. Riesgos e inconvenientes para el participante

La recolección de las muestras de orina y saliva no te causará ningún dolor. Asimismo, la realización de este proceso no posee ningún riesgo. Sin embargo, es importante que tengas en cuenta que los procedimientos podrían provocarte incomodidad y/o ansiedad.

5. Beneficios

No recibirás ningún beneficio directo por tu participación en este estudio. Sin embargo, los datos recogidos en el mismo podrán ayudar a encontrar una forma sencilla y no dolorosa de realizar el seguimiento de la eficacia del tratamiento empleado para tratar la leucemia infantil.

6. Costos e incentivos

No deberás pagar nada por participar en el estudio. Igualmente, no recibirás ningún incentivo económico ni de otra índole.

7. Derechos del participante

Puedes retirar tu asentimiento en cualquier momento, sin necesidad de dar explicaciones y sin que el tratamiento médico que recibas o la relación con el equipo médico que te atiende se vea afectada.

8. Almacenamiento de las muestras

Si nos autorizas, tus muestras podrán ser almacenadas en una congeladora -70°C ubicada en el laboratorio N° 6 de la Sub Unidad de Investigación e Innovación Tecnológica con el propósito de que sean empleadas en investigaciones futuras, ya sea aplicadas o básicas, relacionadas a la enfermedad en estudio (leucemia), otros tipos de cáncer que afectan a niños u infecciones provocadas por microorganismos.

Antes de que estas investigaciones inicien, se solicitará tu autorización y/o la de tu padre para utilizar tus muestras, y se procederá a la firma de un asentimiento o consentimiento informado elaborado exclusivamente para este nuevo estudio.

Las muestras que se recolecten en esta investigación serán almacenadas por un período de 5 años; culminado este periodo, éstas serán eliminadas.

9. Confidencialidad

Tu nombre permanecerá en estricta reserva. Se empleará un código numérico para poder diferenciar tus muestras y datos de los de otros participantes.

La información recolectada y los resultados obtenidos no serán mostrados a ninguna persona ajena al estudio y serán guardados por los investigadores por un periodo de 5 años, siendo posteriormente eliminados. Los registros físicos serán guardados en una gabinete de la Sub Unidad de Investigación e Innovación Tecnológica, bajo llave; mientras que, los registros electrónicos, en la computadora del investigador principal, con contraseña.

Una vez que la investigación culmine, los resultados obtenidos serán publicados en revistas especializadas. Sin embargo, no se mostrará ninguna información que permita la identificación de ninguno de los individuos que participaron en este estudio.

Luego de que los datos obtenidos a partir de tu historia clínica y/o tus informes de laboratorio sean transferidos y guardados en la computadora del investigador principal, y de que se

recolecten las muestras de orina y saliva, ningún documento clínico que contenga tu información personal podrá ser revisado bajo ninguna circunstancia; tampoco te contactaremos a ti y/o a tu padre para consultar sobre datos personales.

10. Personas de contacto

Si tuvieses alguna duda al respecto o sientes que tus derechos han sido vulnerados puedes contactarte con la Dra. Victoria Godoy Vila, al teléfono 952515658 o a su correo electrónico vgodoy@insnsb.gob.pe, con el Comité de Ética del INSN-SB, al teléfono 2300600, anexo 4012, o al correo electrónico comite_etica@insnsb.gob.pe, o con el Presidente del Comité Institucional de Ética de la UPCH, Dr. Luis Saona Ugarte, al teléfono 01-319-0000, anexo 201355.

PARTE II: CERTIFICADO DE ASENTIMIENTO

Datos del estudio para el que se otorga el asentimiento

Instituciones participantes: Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja/ Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Título del proyecto: “MicroRNAs en muestras de orina y saliva como biomarcadores de enfermedad mínima residual en leucemia linfoblástica aguda pediátrica”.

He leído, he sido informado y comprendo el contenido de la presente hoja de información, lo que acredito con mi firma en prueba de mi asentimiento en todo lo que en ella se menciona.

He preguntado y aclarado las posibles dudas al Dr./Dra./ Blgo.

Entiendo que mi participación es voluntaria y gratuita y comprendo que puedo solicitar el retiro de mi asentimiento en cualquier momento, sin tener que ofrecer explicaciones y sin que esto repercuta en los cuidados médicos presentes y/o futuros que se me brinden.

Entiendo que una copia de esta ficha de asentimiento me será entregada y:

- Acepto participar en esta investigación.
- No acepto participar en esta investigación.

Padre o apoderado

Lugar: _____

Fecha: _____

Nombres y apellidos del padre o apoderado:

Firma del padre o apoderado: _____

Testigo

Lugar: _____

Fecha: _____

Nombres y apellidos del testigo: _____

Firma del testigo: _____

Persona que proporciona la información

Lugar: _____

Fecha: _____

Nombres y apellidos de la persona que proporciona la información:

Firma de la persona que proporciona la información:

Almacenamiento de muestras

- Acepto que mis muestras sean almacenadas a fin de que puedan ser utilizadas en investigaciones futuras relacionadas a la enfermedad en estudio (leucemia

linfoblástica aguda), otros tipos de cáncer que afectan a niños u infecciones provocadas por microorganismos.

- No acepto que mis muestras sean almacenadas a fin de que puedan ser utilizadas en investigaciones futuras relacionadas a la enfermedad en estudio (leucemia linfoblástica aguda), otros tipos de cáncer que afectan a niños u infecciones provocadas por microorganismos.

ANEXO 3: CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PADRES

PARTE I: HOJA DE INFORMACIÓN

Instituciones participantes: Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja/ Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Título del proyecto: “MicroRNAs en muestras de orina y saliva como biomarcadores de enfermedad mínima residual en leucemia linfoblástica aguda pediátrica”.

1. Descripción general:

Soy del Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja y estoy realizando un trabajo de investigación que tiene como objetivo capturar ciertos elementos microscópicos en la orina y la saliva que están involucrados en el desarrollo de leucemia.

Antes de decidir si quiere que su niño(a) participe o no, le rogamos lea detenidamente este documento que incluye la información sobre esta investigación. Puede formular todas las preguntas que le surjan y solicitar la aclaración sobre cualquier aspecto del mismo.

La participación de su niño(a) en este estudio es voluntaria. Aunque usted decidiera no autorizar su participación, su niño(a) continuará recibiendo todos los cuidados médicos que pudiera necesitar y la relación con el equipo médico que lo atiende no se verá afectada.

2. Propósito del estudio

Las leucemias son un grupo de enfermedades en las que nuestras células sanguíneas no funcionan de manera adecuada a consecuencia de ciertos cambios que ocurren en elementos microscópicos que se encuentran dentro de las células y contienen información importante para poder vivir. El tratamiento de la enfermedad se basa en el uso de fármacos que destruyen las células sanguíneas que no funcionan de manera adecuada. La medición de la eficacia del tratamiento se realiza en muestras de médula ósea mediante pruebas de laboratorio. Estas muestras se recolectan mediante métodos que ocasionan dolor e incomodidad en el paciente, sobre todo si se trata de niños.

Por este motivo, el objetivo de este estudio es capturar ciertos elementos microscópicos en la orina y saliva, encargados de dirigir o manejar procesos que están asociados con la aparición de leucemia. Esto con el propósito de que, en un futuro, estos elementos puedan ser utilizados como herramientas para el seguimiento de la eficacia del tratamiento contra esta enfermedad, de manera sencilla y sin dolor.

Su hijo(a) ha sido elegido para ser parte de este estudio debido a que su médico solicitó análisis clínicos para determinar si tiene leucemia.

3. Procedimientos del estudio

Le estamos solicitando su autorización para recolectar una muestra de orina y saliva de su hijo(a), ya sea el día de hoy o a los 15 días de iniciado el tratamiento que le dé su médico, dependiendo de los resultados que hayan sido obtenidos en los análisis clínicos.

La recolección de la muestra de saliva será realizada empleando un hisopo de algodón, que será colocado debajo de la lengua durante aproximadamente 60 segundos; mientras que, la recolección de la muestra de orina será realizada empleando un frasco estéril o una bolsa colectora de orina, dependiendo de la edad de su hijo. El volumen de orina y saliva a recolectar será equivalente a aproximadamente una cucharada y media (~20 ml) y una cucharadita (~4 ml), respectivamente. La recolección de ambas muestras tomará aproximadamente 5 minutos.

Las muestras de orina y saliva serán rotuladas con un código numérico y almacenadas en una congeladora a -70°C hasta 5 años después de la toma de muestra, para posteriormente ser eliminadas.

Adicionalmente, se realizará una revisión de la historia clínica y/o informes médicos de su hijo(a) a fin de extraer información de la edad, sexo, lugar de procedencia y datos clínicos.

4. Riesgos e inconvenientes para el participante

La recolección de las muestras de orina y saliva no le causará ningún dolor a su hijo(a). Asimismo, la realización de este proceso no posee ningún riesgo. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los procedimientos podrían provocar incomodidad y/o ansiedad.

5. Beneficios

Usted no recibirá ningún beneficio directo por la participación de su hijo(a) en este estudio. Sin embargo, los datos recogidos en el mismo podrán ayudar a encontrar una forma sencilla y

no dolorosa de realizar el seguimiento de la eficacia del tratamiento empleado para tratar la leucemia infantil.

6. Costos e incentivos

No deberá pagar nada por la participación de su niño(a) en el estudio. Igualmente, no recibirá ningún incentivo económico ni de otra índole.

7. Derechos del participante

Usted puede retirar su consentimiento en cualquier momento, sin necesidad de dar explicaciones y sin que el tratamiento médico que recibe su niño(a) o la relación de éste/ésta con el equipo médico que lo/la atiende se vea afectada.

8. Almacenamiento de las muestras

Si nos autoriza, las muestras de su hijo(a) podrán ser almacenadas en una congeladora -70°C ubicada en el laboratorio N° 6 de la Sub Unidad de Investigación e Innovación Tecnológica con el propósito de que sean empleadas en investigaciones futuras, ya sea aplicadas o básicas, relacionadas a la enfermedad en estudio (leucemia), otros tipos de cáncer que afectan a niños u infecciones provocadas por microorganismos.

Antes de que estas investigaciones inicien, se solicitará la autorización de su hijo(a) y/o de usted para utilizar las muestras recolectadas, y se procederá a la firma de un asentimiento o consentimiento informado elaborado exclusivamente para este nuevo estudio.

Las muestras que se recolecten en esta investigación serán almacenadas por un período de 5 años; culminado este periodo, éstas serán eliminadas.

9. Confidencialidad

El nombre de su hijo(a) permanecerá en estricta reserva. Se empleará un código numérico para poder diferenciar las muestras y datos de su hijo(a) de los de otros participantes.

La información recolectada y los resultados obtenidos no serán mostrados a ninguna persona ajena al estudio y serán guardados por los investigadores por un periodo de 5 años, siendo posteriormente eliminados. Los registros físicos serán guardados en una gabinete de la Sub Unidad de Investigación e Innovación Tecnológica, bajo llave; mientras que, los registros electrónicos, en la computadora del investigador principal, con contraseña.

Una vez que la investigación culmine, los resultados obtenidos serán publicados en revistas especializadas. Sin embargo, no se mostrará ninguna información que permita la identificación de ninguno de los individuos que participaron en este estudio.

Luego de que los datos obtenidos a partir de la historia clínica y/o los informes de laboratorio de su hijo(a) sean transferidos y guardados en la computadora del investigador principal, y de que se recolecten las muestras de orina y saliva, ningún documento clínico que contenga información personal de su niño(a) podrá ser revisado, bajo ninguna circunstancia. Tampoco lo contactaremos a él/ella o a usted para consultar sobre datos personales.

10. Personas de contacto

Si tuviese alguna duda al respecto o siente que sus derechos o el de su hijo(a) han sido vulnerados puede contactarse con la Dra. Victoria Godoy Vila, al teléfono 952515658 o a su correo electrónico vgodoy@insnsb.gob.pe, con el Comité de Ética del INSN-SB, al teléfono 2300600, anexo 4012, o al correo electrónico comite_etica@insnsb.gob.pe, o con el Presidente del Comité Institucional de Ética de la UPCH, Dr. Luis Saona Ugarte, al teléfono 01-319-0000, anexo 201355.

PARTE II: CERTIFICADO DE CONSENTIMIENTO

Datos del estudio para el que se otorga el consentimiento

Instituciones participantes: Instituto Nacional de Salud del Niño San Borja/ Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Título del proyecto: “MicroRNAs en muestras de orina y saliva como biomarcadores de enfermedad mínima residual en leucemia linfoblástica aguda pediátrica”.

He leído, he sido informado y comprendo el contenido de la presente hoja de información, lo que acredito con mi firma en prueba de mi consentimiento en todo lo que en ella se menciona.

He preguntado y aclarado las posibles dudas al Dr./Dra./ Blgo.

Entiendo que la participación de mi hijo(a) es voluntaria y gratuita y comprendo que puedo solicitar el retiro de mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que ofrecer explicaciones y sin que esto repercuta en los cuidados médicos presentes y/o futuros brindados a mi hijo(a).

Entiendo que una copia de esta ficha de consentimiento me será entregada y:

- Doy mi consentimiento para que mi hijo(a) participe en esta investigación.
- No doy mi consentimiento para que mi hijo(a) participe en esta investigación.

Padre o apoderado

Lugar: _____

Fecha: _____

Nombres y apellidos del padre o apoderado:

Firma del padre o apoderado: _____

Testigo

Lugar: _____

Fecha: _____

Nombres y apellidos del testigo: _____

Firma del testigo: _____

Persona que proporciona la información

Lugar: _____

Fecha: _____

Nombres y apellidos de la persona que proporciona la información:

Firma de la persona que proporciona la información:

Almacenamiento de muestras

- Acepto que las muestras de mi hijo(a) sean almacenadas a fin de que puedan ser utilizadas en investigaciones futuras relacionadas a la enfermedad en estudio (leucemia linfoblástica aguda), otros tipos de cáncer que afectan a niños u infecciones provocadas por microorganismos.

- No acepto que las muestras de mi hijo(a) sean almacenadas a fin de que puedan ser utilizadas en investigaciones futuras relacionadas a la enfermedad en estudio (leucemia linfoblástica aguda), otros tipos de cáncer que afectan a niños u infecciones provocadas por microorganismos.

ANEXO 4: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

1. Código: _____

2. Edad: _____ años

3. Sexo:
 - Masculino
 - Femenino

4. Lugar de procedencia: _____

5. Porcentaje de blastos en sangre periférica y/o médula ósea al momento del diagnóstico:
_____ %

6. Conteo de leucocitos al momento del diagnóstico: _____ cel/ μ l

7. Conteo de neutrófilos al momento del diagnóstico: _____ cel/ μ l

8. Conteo de plaquetas al momento del diagnóstico: _____ cel/ μ l

9. Nivel de hemoglobina al momento del diagnóstico: _____ g/ dl

10. Aberración cromosómica:

- Hipodiploidía
- Hiperdiploidía baja
- Hiperdiploidía alta
- Cariotipo normal
- Cariotipo complejo
- Aberración numérica
- Aberración estructural
- Aberración numérica más aberración estructural

11. Gen de fusión:

- BCR-ABL p190
- BCR-ABL p210
- TEL-AML1
- E2A-PBX1
- MLL-AF

12. Inmunofenotipo de LLA:

- LLA tipo B
- LLA tipo T

13. Respuesta a prednisona

- Positiva (< 1000 blastos/ μ l)
- Negativa (≥ 1000 blastos/ μ l)

14. Enfermedad mínima residual en el día 15 de la quimioterapia

- EMR \geq 10%. Especificar (%): _____
- EMR $<$ 10%. Especificar (%): _____

ANEXO 5: FÓRMULAS MATEMÁTICAS PARA EL CÁLCULO MANUAL DEL TAMAÑO DE MUESTRA

1. Fórmula para el cálculo del tamaño de muestra en base a un valor de “fold change”

(104)

$$n = 2 \left(z_{\alpha} - \frac{\alpha}{2} + z_{\beta} \right)^2 \frac{\left(\frac{1}{\mu} + \sigma^2 \right)}{(\log_e \Delta^2)}$$

Donde:

z_{α} =percentil superior α -ésimo de la distribución normal estándar, donde α es el error tipo I

z_{β} =percentil superior β -ésimo de la distribución normal estándar, donde α es el error tipo II

Δ =fold change

μ =profundidad de la cobertura

σ =coeficiente de variación para el gen, entre réplicas biológicas

2. Fórmula para el cálculo del tamaño de muestra en base a un valor de AUC ROC (151)

$$n = \frac{[z_{\alpha} \sqrt{0.0792 \times \left(1 + \frac{1}{k}\right)} + z_{\beta} \sqrt{V(\theta)}]^2}{(\theta - 0.5)^2}$$

Donde:

$$V(\theta) = \left(0.0099 \times e^{\frac{-A^2}{2}} \right) \times \left([5A^2 + 8] + \frac{[A^2 + 8]}{k} \right)$$

$$A = \Phi^{-1}(\theta) \times 1.414$$

Φ^{-1} =inversa de la distribución acumulativa normal estándar

k =ratio del número de pacientes controles y pacientes con la enfermedad

θ =AUC ROC conjeturada (bajo la hipótesis alternativa)

z_{α} =percentil superior α -ésimo de la distribución normal estándar, donde α es el error tipo I

z_{β} =percentil superior β -ésimo de la distribución normal estándar, donde α es el error tipo II

ANEXO 6: RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE PCA EN SALIVA

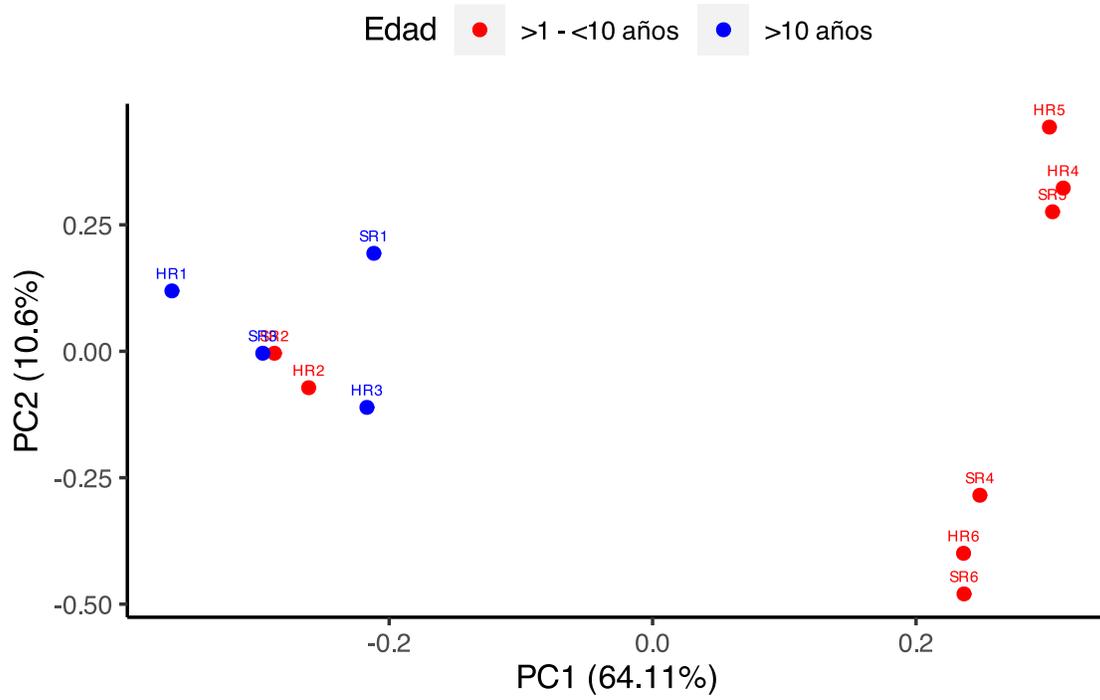


Figura 31. PCA según edad, en saliva

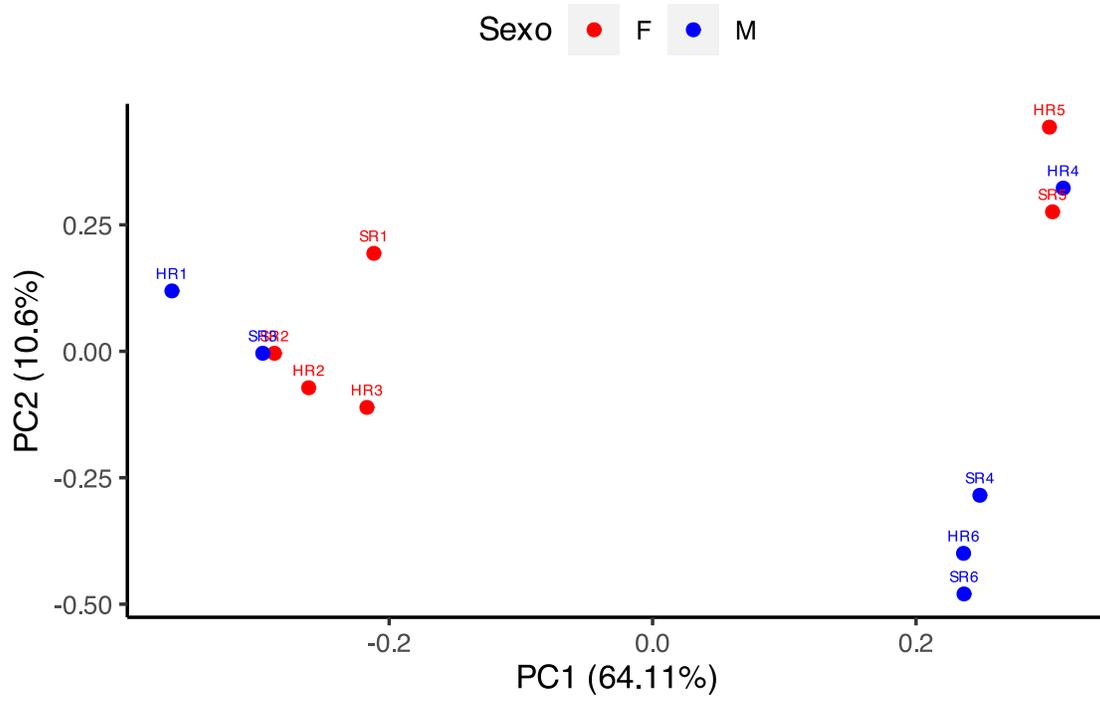


Figura 32. PCA según sexo, en saliva

F = femenino. M = masculino.

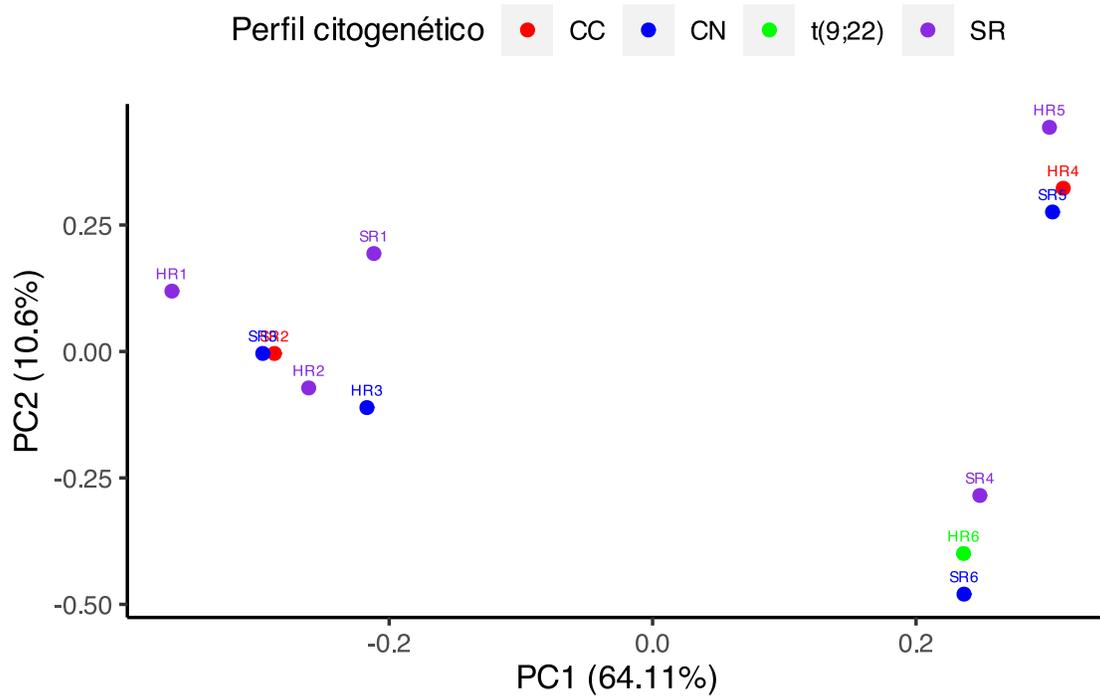


Figura 33. PCA según perfil citogenético, en saliva

CC: cariotipo complejo. CN: cariotipo normal. T(9;22): traslocación 9;22. SR: sin resultado.

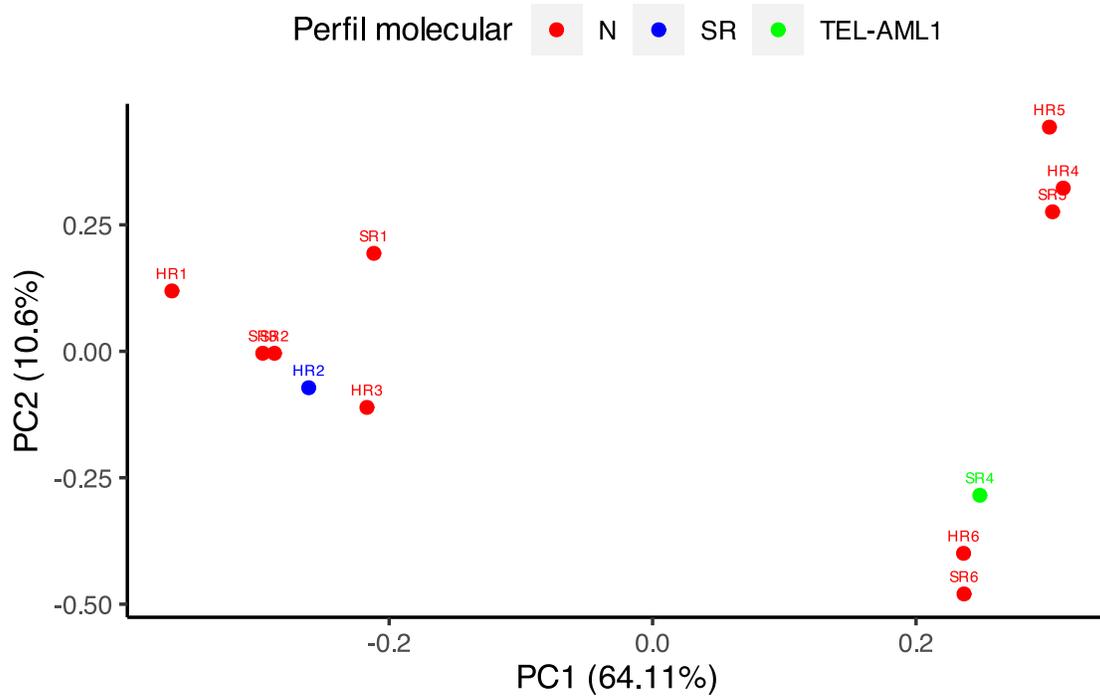


Figura 34. PCA según perfil molecular, en saliva

N: negativo para BCR-ABL, TEL-AML1, E2A-PBX1 y MLL-AF. SR: sin resultado.

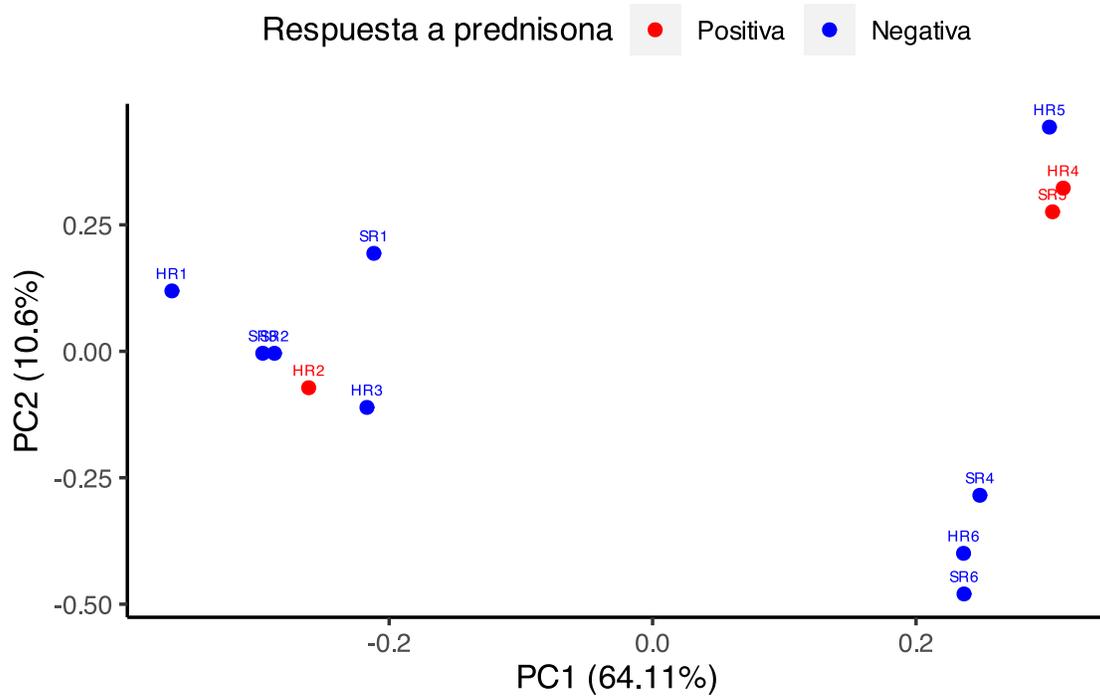


Figura 35. PCA según respuesta a prednisona, en saliva

ANEXO 7: RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DE PCA EN ORINA

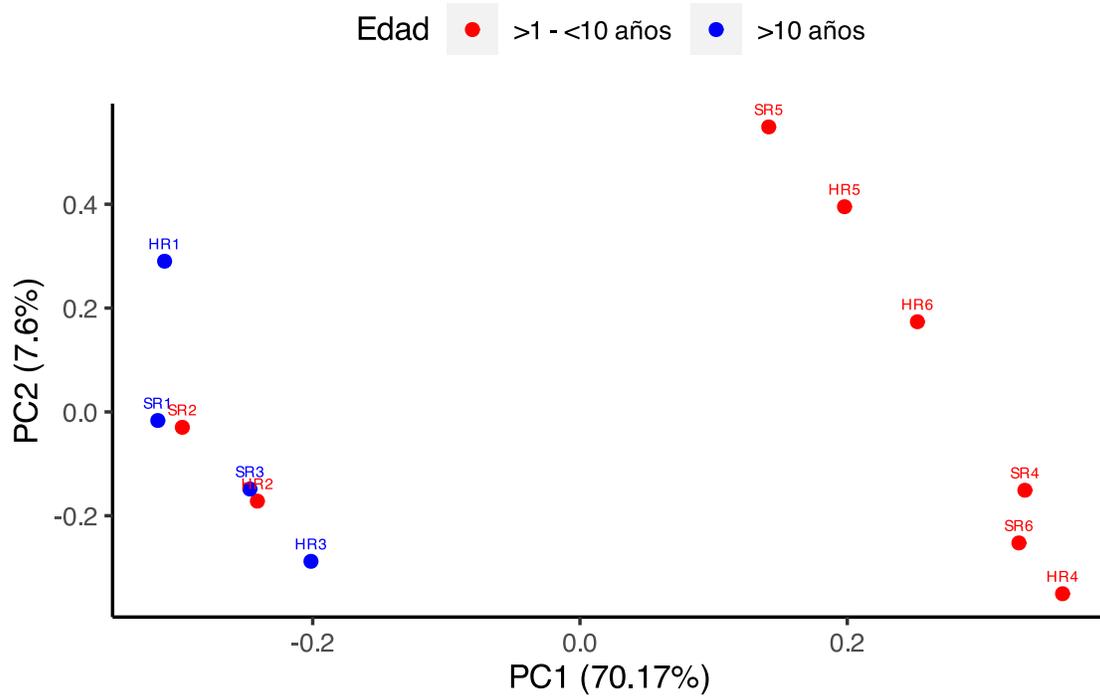


Figura 36. PCA según edad, en orina

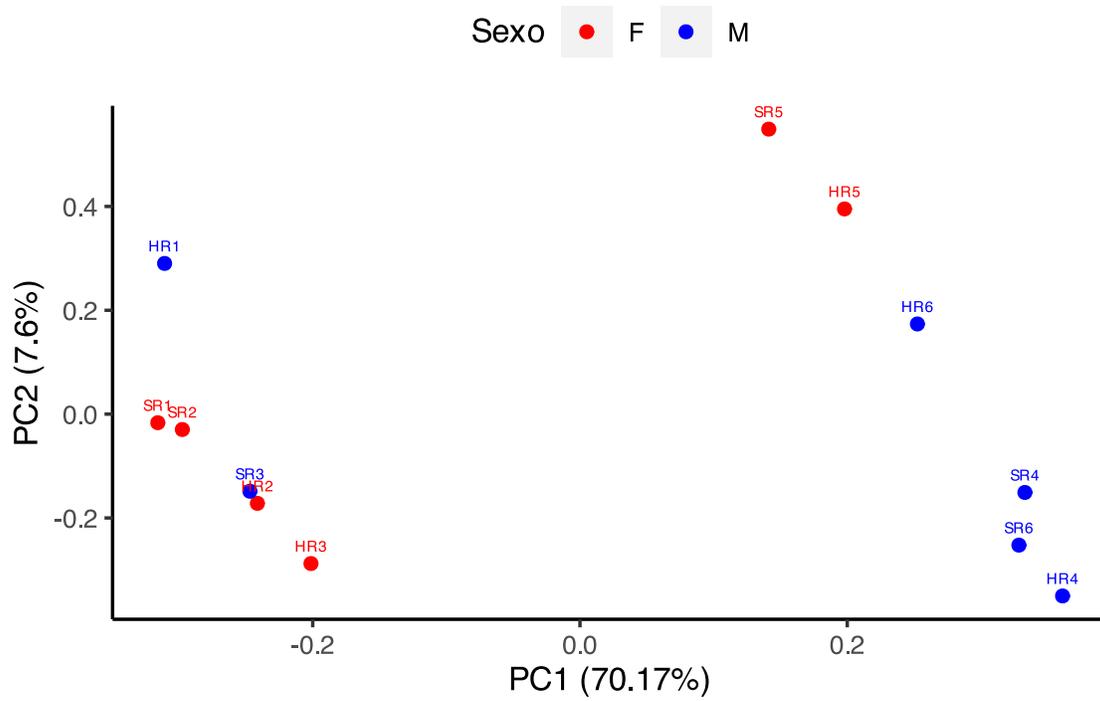


Figura 37. PCA según sexo, en orina

F = femenino. M = masculino.

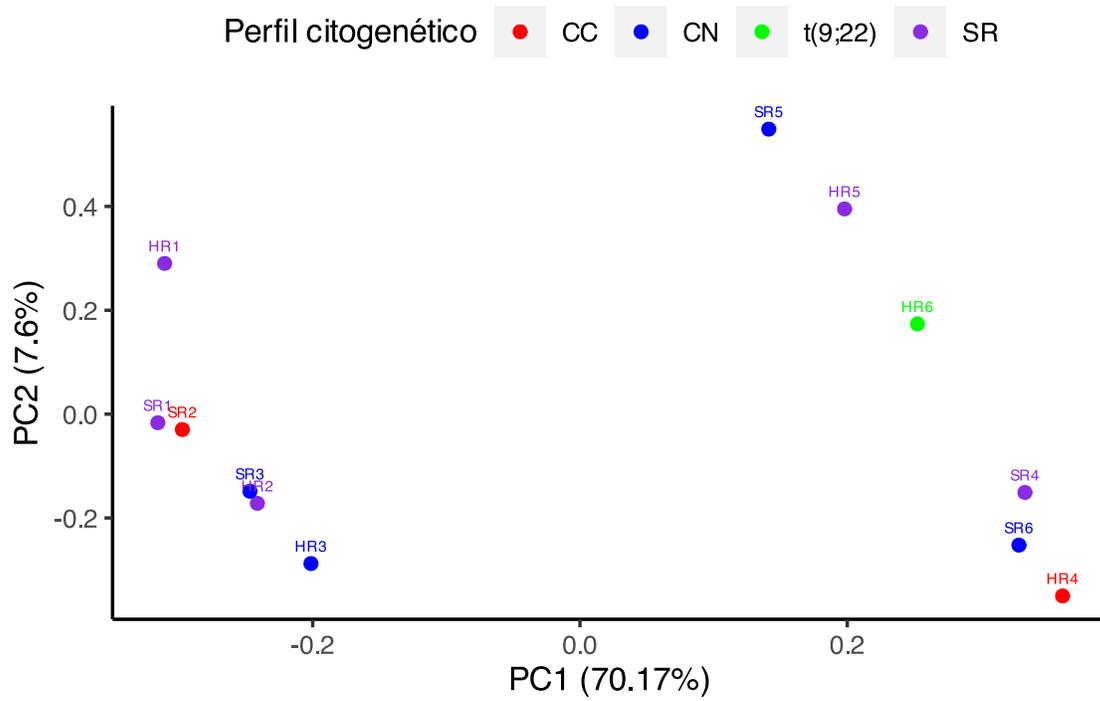


Figura 38. PCA según perfil citogenético, en orina

CC: cariotipo complejo. CN: cariotipo normal. t(9;22): traslocación 9;22. SR: sin resultado.

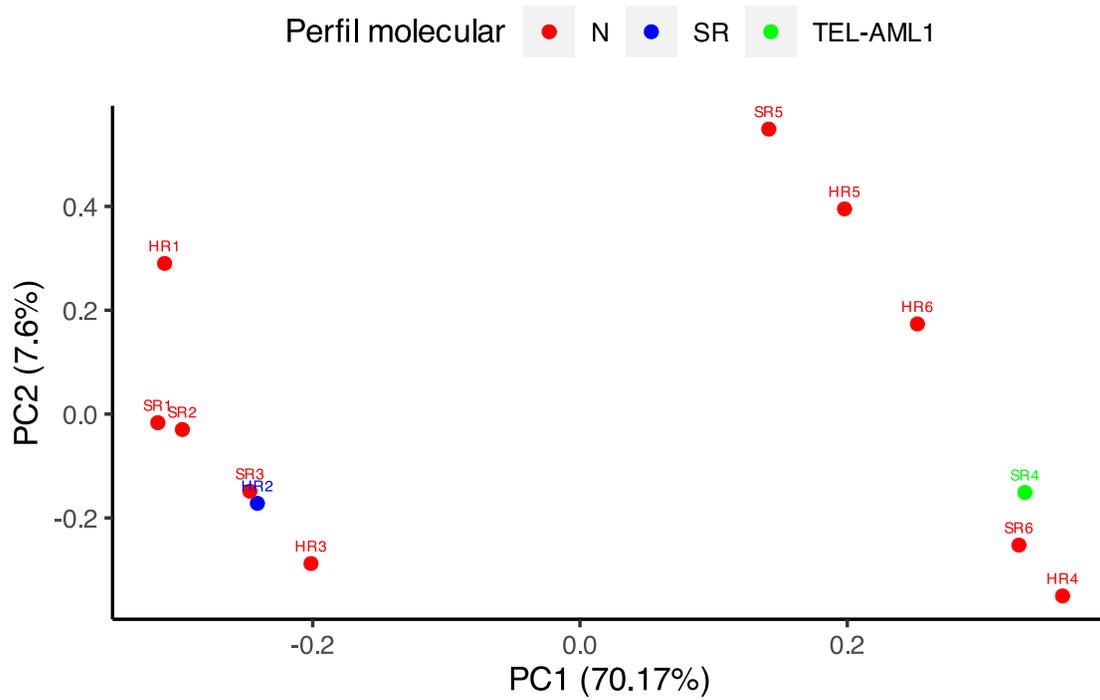


Figura 39. PCA según perfil molecular, en orina

N: negativo para BCR-ABL, TEL-AML1, E2A-PBX1 y MLL-AF. SR: sin resultado.

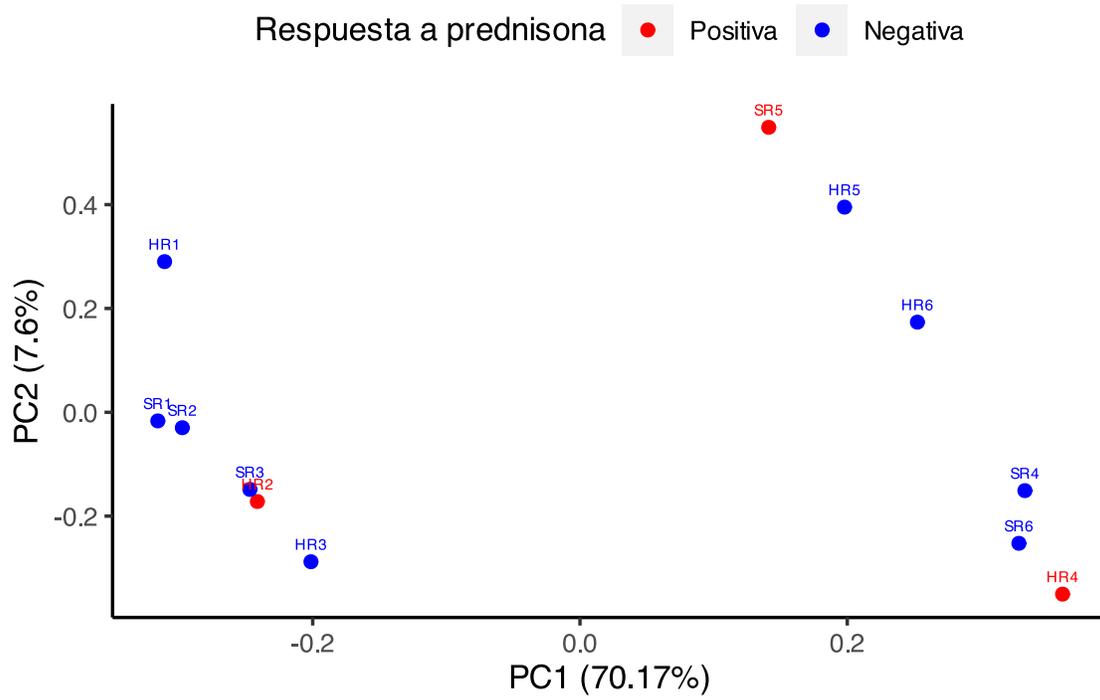


Figura 40. PCA según respuesta a la prednisona, en orina