



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



TÍTULO DEL TRABAJO

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

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

PRESENTA

Q.F.B. Dinora Margarita Alvarado Zamarripa

DIRECTOR

Dr. Juan Manuel Vargas Morales

Co-DIRECTORA

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

ASESOR

Dra. Edith Elena Uresti Rivera

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



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

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT:745696

CVU 1007624

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

Registro: 25-17



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



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



TÍTULO DEL TRABAJO

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

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

PRESENTA

Q.F.B. Dinora Margarita Alvarado Zamarripa

SINODALES

PRESIDENTE

Dr. Juan Manuel Vargas Morales

SECRETARIO

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

PRIMER VOCAL

Dra. Edith Elena Uresti Rivera

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



San Luis Potosí, S.L.P.

Agosto 15, 2021

Comité Académico del Posgrado

En Ciencias Farmacobiológicas

Facultad de Ciencias Químicas/UASLP

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

ANTENTAMENTE

Dr. Juan Manuel Vargas Morales
Director de Tesis

Dra. Diana Patricia Portales Pérez
Co-Directora

Dra. Edith Uresti Rivera
Asesor

www.uaslp.mx

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

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

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

RESUMEN

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

Palabras clave: Leucemia linfoblástica aguda, NATs, miRNAs

ABSTRACT

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

Key words: Acute lymphoblastic leukemia, NATs, miRNAs

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. MATERIAL Y MÉTODOS	3
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	4
5. CONCLUSIONES	6
6. BIBLIOGRAFÍA.....	7

1. INTRODUCCIÓN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el resultado de la proliferación neoplásica de la célula progenitora de linfocitos B o T, con una mayor prevalencia entre los 2 y 5 años de edad. Aunque la etiología de la LLA es compleja y no ha podido ser elucidada, estudios demuestran que solo aproximadamente el 10% de los casos de cáncer pediátrico muestran una predisposición genética, por lo que, alteraciones en distintos mecanismos a nivel epigenético, así como distintos factores ambientales, son necesarios para el proceso de generación y progresión de LLA. (Chow et al., 2017)

La actividad modificada de enzimas metabolizadoras de medicamentos y xenobioticos ambientales, como son la N-acetiltransferasas NAT1 y NAT2, modifican la susceptibilidad o riesgo de cáncer, además, la población pediátrica puede presentar un mayor riesgo que los adultos a una gran cantidad de tóxicos ambientales debido a una exposición diferencial, así como a una inmadurez fisiológica. La mayoría de los estudios realizados sobre NATs se han enfocado en las alteraciones genéticas que se presentan en dichas enzimas, como son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), sin embargo, además de conocer la regulación genética de estas enzimas, resulta importante la caracterización de una nueva vía de regulación de NAT1: la regulación epigenética por miRNAs. (Hernández, O. et al. 2017)

Un importante mecanismo de regulación epigenética, cuya alteración o expresión aberrante parece estar relacionada con el proceso de generación y progresión de cáncer, son los miRNAs -pequeños fragmentos de RNA no codificante de 22-25 nucleótidos de longitud- encargados de regular la expresión de más del 60% de los genes humanos, reprimiendo la traducción de sus genes blanco. Dada la importancia de los miRNAs en los procesos de generación tumoral, su expresión en enfermedades y tejidos específicos, su estabilidad metabólica en tejidos y líquidos

biológicos, incluyendo suero, plasma y orina, resultan tener un gran potencial como blancos terapéuticos, así como potenciales biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de cáncer, incluido LLA. (Shah et al., 2010)

La regulación en la expresión genética mediada por miRNAs, parece tener un efecto importante en la regulación de la expresión y/o actividad de NAT1; NAT1 es blanco de regulación de distintos miRNAs, por lo que, la evaluación de la expresión de estos, puede tener aplicación clínica como biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y de posibles blancos terapéuticos en LLA. (Navarrete-Meneses & Pérez-Vera, 2017)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

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

2.2 Objetivos específicos

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

- Analizar la asociación que existe entre los niveles de expresión de miR-1290 y miR-26b con los niveles de expresión de NAT1 en pacientes pediátricos con LLA-B y sujetos control.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Definición de la población y obtención de muestras sanguíneas

El presente trabajo es un estudio transversal donde fueron incluidos niños menores de 18 años con diagnóstico confirmado de LLA-B provenientes del área de hematología pediátrica para el grupo de LLA y niños menores de 18 años que no presentaran ningún tipo de neoplasia para el grupo control provenientes del área de Pediatría del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”. Se contó con un grupo de pacientes con LLA-B con una n=17 y un grupo de sujetos control con una n=17. Se les extrajo a los participantes sangre venosa periférica en tubos Vacutainer de 6 mL con EDTA. El plasma fue separado por medio de centrifugación, se hicieron alícuotas en tubos eppendorf de 1.5 mL. Las muestras de plasma se almacenaron a -80°C hasta su uso.

3.2 RT-qPCR

El ARN total fue extraído a partir de 17 muestras de plasma de pacientes con LLA-B y de 17 sujetos sanos utilizando el método del TRIzol (Introvigen). La cantidad y pureza del RNA se determinó mediante medición espectrofotométrica a 260 nm utilizando el espectrofotómetro Epoch (BioTek), el ARN fue almacenado a -80°C hasta su utilización. El DNAc fue sintetizado a partir de 300 ng de ADNc por medio de transcripción reversa utilizando el TaqMan MicroRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones de manufactura.

La expresión relativa de los miRNAs miR-1290 y miR-26b, seleccionados como potenciales reguladores de NAT1, fue evaluada por medio de qPCR utilizando como control endógeno miR-16-5p. Las reacciones de qPCR se realizaron por duplicado incluyendo un control negativo sin templado (NTC) en el sistema de detección BIO-RAD CFX96 (BioRad Laboratories, Hercules, EUA), con el uso de qPCR ProbesMaster (Jena Bioscience) y con primers específicos para cada miRNA. Se realizó una qPCR dúplex para miR-1290/miR-26b y una qPCR individual para miR-16-5p. La expresión relativa de los miRNAs fue determinada empleando el método $2^{-\Delta Ct}$.

3.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico correspondiente se realizó con el programa IBM SPSS Statistics v.21. y GraphPad v.5. La comparación de la expresión de los miRNAs entre ambos grupos se evaluó utilizando la prueba U de Mann Whitney. Se analizó la asociación entre las variables explicativas (valor absoluto de NAT1, glóbulos blancos, linfocitos, eritrocitos y hemoglobina) con la expresión relativa de miR-1290, tanto para el grupo LLA como para grupo control, por medio de un análisis del coeficiente de correlación de Spearman. En el caso de variables categóricas se evaluó la asociación con la prueba exacta de Fisher y cálculo del odds ratio (OR) con un intervalo de confianza al 95%. Una $p < 0.05$ fue considerada como diferencia estadísticamente significativa.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se incluyeron 17 pacientes con LLA y 17 sujetos sanos con una media de edad de 9.2 ± 3.6 años para los pacientes con LLA y de 8.9 ± 3.2 años para el grupo control. La prueba de t-student indicó que no existen diferencias en la media del peso, IMC y estatura en los pacientes con LLA, comparado con el grupo

control, lo que indica una homogeneidad en las características demográficas y antropométricas en los sujetos de ambos grupos de estudio. Se evaluaron las variables hematológicas en el grupo de pacientes con LLA y se compararon con el grupo control, encontrando una disminución significativa en los valores de glóbulos blancos en los pacientes con LLA comparado con el grupo control ($p < 0.0001$), de igual manera se observa una disminución significativa en los valores de linfocitos y eritrocitos ($p = 0.0022$)

A partir del RNA obtenido del plasma de los 17 pacientes con LLA y los 17 controles, se evaluó por medio de RT-qPCR la expresión relativa de miR-1290 y miR-26b. Se utilizó el método de $2^{-\Delta Ct}$ para determinar la expresión relativa de miR-1290 y miR-26b, utilizando como control endógeno a miR-16-5p. miR-1290 mostró una diferencia marginalmente significativa en su expresión entre ambos grupos ($p = 0.067$), observándose una tendencia a una mayor expresión de dicho miRNA en los pacientes con LLA comparado con el grupo control, mientras que en miR-26b no se observó ninguna diferencia significativa entre ambos grupos de estudio.

Se llevó a cabo la estratificación de pacientes y controles en base a las características de sexo, IMC y recaída, encontrando en el grupo de mujeres con LLA una diferencia significativa en la expresión de miR-1290 comparada con el grupo control ($p = 0.009$), de igual manera se encontró que aquellos pacientes que mostraban mayor expresión de miR-1290 pertenecían al grupo de recaída

Por otra parte, No se encontraron asociaciones significativas entre la expresión relativa de miR-1290 con el valor absoluto de NAT1 en linfocitos totales en ambos grupos de estudio ni con las variables hematológicas de glóbulos blancos, eritrocitos y hemoglobina.

La leucemia linfoblástica aguda es el tipo de cáncer más común en niños. A pesar de que existe gran cantidad de estudios que han contribuido a mejorar la sobrevida en pacientes con leucemia, poco se sabe acerca de los acontecimientos que conducen al inicio y progresión de dicha enfermedad. Los microRNAs (miRNAs) son

reconocidos como una clase de moléculas pequeñas de RNA no codificantes, que desempeñan un rol importante en la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional. La evidencia emergente ha confirmado la importante función de los miRNAs en el desarrollo y progresión de cáncer, incluido LLA. La expresión aberrante de distintos miRNAs circulantes parece afectar la expresión de sus genes blancos, contribuyendo al proceso de carcinogénesis, por lo que resultan ser potenciales biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y blancos terapéuticos en LLA. (Lu et al., 2005). Con el objetivo de evaluar un mecanismo de regulación epigenética de la expresión de NAT1 y su posible implicación en la generación y progresión de LLA, se evaluó la expresión relativa de miR-1290 y miR-26b en plasma de pacientes pediátricos con LLA y se comparó con un grupo control, encontrando una tendencia a una mayor expresión de miR-1290 en pacientes con LLA, mientras que la expresión de miR-26b no mostró diferencia significativa. Los valores de glóbulos blancos, linfocitos, eritrocitos y hemoglobina se encontraban disminuidos en pacientes con LLA.

Un estudio previo realizado en nuestro equipo de investigación por Hernández O. et al, se encontró un menor porcentaje de expresión, así como una actividad disminuida de NAT1 en pacientes pediátricos con LLA comparado con un grupo control. La expresión al alta de miR-1290 pudiera tener relación con niveles bajos de NAT1, sin embargo, dicho trabajo fue evaluado en CMN, por lo que resultaría relevante evaluar los niveles de expresión de miR-1290 en dichas células y comparar su expresión con miR-1290 circulante en plasma o bien, incrementar el número de muestras analizadas para aumentar la significancia estadística.

5. CONCLUSIONES

El presente estudio provee evidencia de que la expresión relativa de miR-1290 muestra una tendencia al incremento en pacientes con LLA, principalmente en pacientes del grupo de mujeres y pacientes que mostraron recaída, sin embargo, más estudios son necesarios para proponer el rol de miR-1290 como posible

biomarcador pronóstico o blanco terapéutico en LLA. Por otra parte, miR-26b no muestra diferencias en su expresión en pacientes con LLA con respecto al grupo control y al mismo tiempo se demostró que miR-16-5p puede ser utilizado como un control endógeno normalizador en LLA.

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

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Chow YP, Alias H, Jamal R. Meta-analysis of gene expression in relapsed childhood B-acute lymphoblastic leukemia. *BMC Cancer*. 2017 Feb 10;17(1):120
2. Hernández-González O, Ortiz-Zamudio JJ,. Genetic polymorphisms of arylamine N-acetyltransferases 1 and 2 and the likelihood of developing pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2018 Aug;59(8):1968-1975
3. Shah, A., Leidinger, P., Blin, N., & Meese, E. (2010). miRNA: small molecules as potential novel biomarkers in cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 17(36), 4427–4432.
4. Navarrete-Meneses, M. del P., & Pérez-Vera, P. (2017). Alteraciones epigenéticas en leucemia linfoblástica aguda. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 74(4), 243–264.
5. Endo Y, Yamashita H, Takahashi S, Sato S, Yoshimoto N, Asano T, Hato Y, Dong Y, Fujii Y, Toyama T. Immunohistochemical determination of the miR-1290 target arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1) as a prognostic biomarker in breast cancer. *BMC Cancer*. 2014 Dec 20;14:990