



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas

**Evaluación de microRNAs y lncRNAs exosomales
involucrados en la regulación de NAT1 y su papel en
leucemia linfoblástica aguda**

Tesis que para obtener el grado de:

Doctorado en Ciencias Farmacobiológicas

Presenta:

Zavala Reyes Daniel

Directora de Tesis:

Dra. Diana Patricia Portales Pérez

Codirector de Tesis:

Dr. Juan Manuel Vargas Morales



UASLP-Sistema de Bibliotecas

Repositorio Institucional Tesis digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en este Trabajo Terminal está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo, mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Evaluación de microRNAs Y LncRNAs exosomales involucrados en la regulación de NAT1 y su papel en leucemia linfoblástica aguda © 2024 by Zavala Reyes, Daniel is licensed under [Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivatives 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Este proyecto se realizó en *el Centro de investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina CICSaB* adscrito a *la Facultad de Medicina de la UASLP*, en el periodo comprendido entre *enero de 2019 y diciembre de 2024*, bajo la dirección de la Dra. Diana Patricia Portales Pérez y el Dr. Juan Manuel Vargas Morales fue apoyado por Proyecto No. 40757/2020 y por asesorías y servicios industriales 17 y 34 (JMVM).

El programa Doctorado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del CONAHCYT, registro 003382. Número de la beca otorgada por CONAHCYT: 733824 . Número de CVU 777948

Los datos del trabajo titulado Evaluación de microRNAs y lncRNAs exosomales involucrados en la regulación de NAT1 y su papel en leucemia linfoblástica aguda se encuentran bajo el resguardo de la Facultad de Ciencias Químicas y pertenecen a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



DOCTORADO EN CIENCIAS FARMACOBIOLOGICAS

REGISTRO DE TESIS DE DOCTORADO

GENERACIÓN Enero 2019- 2023

Nombre del Alumno M.C. Daniel Zavala Reyes

Tema de Tesis Evaluación de microARNs y lncARNs exosomales involucrados en la regulación de NAT1 y su papel en leucemia linfoblástica aguda

Línea de Investigación en la que se inserta la Tesis: Estudios Biofarmacéuticos y Farmacocinéticos para el uso Racional de Medicamentos, Oncoinmunología.

COMITÉ TUTELAR

	Nombre	Firma
Director de tesis	Dra. Diana Patricia Portales Pérez	
Asesor del PCFB	Dra. Edith Elena Uresti Rivera	
Asesor del PCFB	Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia	
Asesor externo	Dra. Rosana Pelayo Camacho Centro de Investigación Biomédica de Oriente CIBIOR (IMSS) Puebla, Pue. México.	

Trabajo de tesis vinculada con:

Convenio _____ Servicio _____ Proyecto x Grupo _____ Artículo _____



San Luis Potosí, S.L.P., a 14 de marzo de 2017

M.C. Oswaldo Hernández González

Investigador Principal:

Por este medio se le comunica que su protocolo de investigación titulado **"Evaluación del estado epigenético de las N-acetiltransferasas NAT1 y NAT2 en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda"**, fue evaluado por el Comité de Investigación, con Registro en COFEPRIS 14 CI 24 028 083, así como por el Comité de Ética en Investigación de esta Institución con Registro CONBIOETICA-24-CEI-001-20160427, y fue dictaminado como:

APROBADO

El número de registro es **25-17**, el cual deberá agregar a la documentación subsecuente, que presente a ambos comités.

De igual forma pido sea tan amable de comunicar a los Comités de Investigación y de Ética en Investigación: la fecha de inicio de su proyecto, la evolución y el informe final pertinente.

*Se le recuerda que todos los pacientes que participen en el estudio deben firmar la versión sellada del formato de consentimiento informado.

Atentamente

Dra. Ma. Del Pilar Fonseca Leal

Sub-Directora de Educación e Investigación en Salud
Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto"

C.C.P. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas

**Evaluación de miRNAs y LncRNAs exosomales
involucrados en la regulación de NAT1 y su papel en
leucemia linfoblástica aguda**

Tesis que para obtener el grado de:

Doctorado en Ciencias Farmacobiológicas

Presenta:

Zavala Reyes Daniel

SINODALES:

Presidente:	Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia
Secretario:	Dra. Edith Elena Uresti Rivera
Vocal:	Dra. Mariana Haydee García Hernández
Vocal:	Dra. Diana Patricia Portales Pérez
Vocal:	Dr. Juan Manuel Vargas Morales
Suplente	Dra. Eneida Turiján Espinoza

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Diana Patricia Portales Pérez. Adscrita al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

CODIRECTOR DE TESIS: Dr. Juan Manuel Vargas Morales. Adscrito al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

ASESORA: Dra. Rosa del Carmen Milán Segovia: Adscrita al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

ASESORA: Dra. Edith Elena Uresti Rivera. Adscrita al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

ASESORA: Dra. Mariana Haydee García Hernández. Adscrita al Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí Investigadora de la Unidad de Investigación Biomédica, IMSS, Zacatecas.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas
Programa de Doctorado

Formato D5

Carta Cesión de Derechos

San Luis Potosí SLP a noviembre/29/2024

En la ciudad de San Luis Potosí el día 29 del mes de noviembre del año 2024 El que suscribe Daniel Zavala Reyes Alumno(a) del programa de posgrado Ciencias Farmacobiológicas adscrito a Facultad de Ciencias Químicas manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: Dra. Diana Patricia Portales Pérez y la codirección de : Dr. Juan Manuel Vargas Morales cede los derechos del trabajo titulado Evaluación de microRNAs y lncRNAs exosomales involucrados en la regulación de NAT1 y su papel en leucemia linfoblástica aguda a la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir de forma total o parcial texto, gráficas, imágenes o cualquier contenido del trabajo si el permiso expreso del o los autores. Éste, puede ser obtenido directamente con el autor o autores escribiendo a la siguiente dirección daniel.zavala.reyes@outlook.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Daniel Zavala Reyes



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas
Programa de Doctorado

Formato D28

Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a Noviembre/ 25 /2024

L.B. María Zita Acosta Nava
Biblioteca de Posgrado FCQ

Asunto: Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada: "*Evaluación de microRNAs y lncRNAs exosomales involucrados en la regulación de NAT1 y su papel en leucemia linfoblástica aguda*" presentada por el autor **Daniel Zavala Reyes**. La tesis es requisito para obtener el grado de Maestría en el Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas. El análisis reveló un porcentaje de similitud de 13 % excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Dr. Sergio Zarazúa Guzmán
Coordinador Académico del Posgrado
en Ciencias Farmacobiológicas

Este trabajo no sería una realidad sin el apoyo incondicional de diversas personas e instituciones a las que deseo expresar mi más sincero agradecimiento. En primer lugar, a mi director de tesis, a la Dra. Diana por su guía experta, paciencia infinita y constante motivación a lo largo de esta etapa. Su invaluable conocimiento y sabias sugerencias fueron cruciales para la culminación de este proyecto. También a mi codirector de tesis Dr. Juan Manuel, Gracias por sus consejo e invaluable apoyo para la adquisición de fondos. Agradezco a la Dra. Edith Uresti por sus consejos para lograr amplificar los miRNAsy H19, sin sus consejos no lo hubiera logrado. también agradezco a mi comité, por sus perspicaces comentarios y aportaciones que enriquecieron significativamente esta investigación. Extiendo mi gratitud a mis compañeros de CICSaB, Osiel, Lorena Martínez, Saul Varela, Lorena Coronado, Martha por su apoyo, compañerismo y las fructíferas discusiones que inspiraron nuevas ideas. Agradezco a María Fernanda, mi corazón por su paciencia y cariño durante estos últimos meses para poder culminar esta etapa. Finalmente, a mis padres Juan y Martha por su amor incondicional, comprensión y aliento inquebrantable durante todos estos años. Su presencia constante fue mi mayor fortaleza.

Este trabajo está dedicado en honor a mi Hermana Martha Cecilia, que perdió la lucha contra la Leucemia Linfoblástica Aguda, este trabajo siempre fue con el propósito de buscar nuevas alternativas, mejores diagnósticos y tratamientos para que cada vez menos personas pierdan la lucha contra esta enfermedad, hasta el cielo, Gracias Hermana.

Resumen en español

Introducción: La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es un cáncer frecuente en niños caracterizado por altos niveles de blastos en la médula ósea, influenciado por factores genéticos y del microambiente. Variantes genéticas de la enzima NAT1, regulada por miRNAs y LncRNAs se ha asociado con predisposición a LLA.

Objetivo: Este estudio analizó las características de los exosomas de pacientes con LLA en diagnóstico reciente, en tratamiento y controles sanos, evaluando su tamaño, potencial zeta, inmunofenotipo y expresión de miR-1290, miR-26b, miR-126 y LncRNA H19.

Resultados: Los exosomas de pacientes con LLA mostraron mayor tamaño y menor complejidad respecto a controles, con niveles más bajos de exosomas CD81+CD63+CD9+, particularmente en casos de diagnóstico reciente.

También se detectó menor expresión de CD19 y mayor de CD34 en los pacientes de LLA, mientras que CD10 se expresó en ambos grupos. Además, pacientes con LLA, especialmente del subtipo Pro-B (B1), presentaron un aumento significativo en la expresión de miR-1290 y LncRNA H19 en comparación con controles.

Conclusión: Estos resultados sugieren que los exosomas no solo reflejan la fisiopatología de LLA, sino que también podrían desempeñar un papel crucial en su desarrollo y progresión. Por tanto, los exosomas y su contenido de RNA no codificante destacan como posibles biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. Este hallazgo abre la puerta a investigaciones futuras para entender mejor su rol funcional y su potencial en terapias dirigidas.

Palabras clave: Leucemia linfoblástica aguda, LLA, Exosomas, miRNAs, miR-1290, miR-26b, miR-126, LncRNA H19, NAT1, Biomarcador, Inmunofenotipo, Tamaño de partícula, Potencial zeta

Resumen en inglés

Introduction: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a common cancer in children characterized by high levels of blasts in the bone marrow, influenced by genetic and microenvironmental factors. Genetic variants of the enzyme NAT1, regulated by miRNAs and LncRNAs, have been associated with predisposition to ALL. **Objective:** This study analyzed the characteristics of exosomes from newly diagnosed ALL patients, under treatment and healthy controls, evaluating their size, zeta potential, immunophenotype and expression of miR-1290, miR-26b, miR-126 and LncRNA H19. **Results:** Exosomes from ALL patients showed larger size and lower complexity compared to controls, with lower levels of CD81+CD63+CD9+ exosomes, particularly in newly diagnosed cases. Lower CD19 and higher CD34 expression was also detected in ALL patients, while CD10 was expressed in both groups. In addition, ALL patients, especially of the Pro-B (B1) subtype, had significantly increased expression of miR-1290 and LncRNA H19 compared to controls. **Conclusion:** These results suggest that exosomes not only reflect the pathophysiology of ALL, but may also play a crucial role in its development and progression. Therefore, exosomes and their non-coding RNA content stand out as potential biomarkers for the diagnosis and prognosis of the disease. This finding opens the door for future research to better understand their functional role and their potential for targeted therapies.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemia, ALL, Exosomes, miRNAs, miR-1290, miR-26b, miR-26b, miR-126, LncRNA H19, NAT1, Biomarker, Immunophenotype, Particle size, Zeta potential.

Índice general

Introducción	14
Antecedentes	15
Arilamina N-Acetiltransferasa 1	15
RNA no codificante miRNAs y LncRNAs.....	16
Exosomas	17
Justificación	17
Hipótesis	18
Objetivos	18
General	18
Específicos.....	18
Material y métodos	19
Tipo de estudio.....	19
Universo de estudio.....	19
Preparación de muestras	19
Caracterización física	20
Citometría de flujo.....	20
Extracción de RNA exosomal.....	20
PCR de miRNAs y LncRNAs.....	21
Análisis estadístico	21
Resultados	22
Los exosomas de pacientes con LLA son más grandes y menos complejo	22
Los exosomas de pacientes con primer diagnóstico de LLA muestran diferente inmunofenotipo	28
Expresión de miRNAs exosomales	36
Expresión del LncRNA exosomal H19	39
Análisis de componentes principales	41
Correlación de las variables.....	44
Discusión	46
Conclusiones	53

Bibliografía	54
Anexos	59

Introducción

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es un tipo de cáncer que afecta a la sangre y la médula ósea, caracterizado por la proliferación descontrolada de linfoblastos inmaduros. Estos linfoblastos, que normalmente se desarrollan en células sanguíneas sanas, se acumulan y desplazan a las células normales, comprometiendo la producción de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. Esto puede llevar a síntomas como anemia, fatiga, infecciones recurrentes y sangrado. A pesar de los avances en el tratamiento de la LLA, su etiología sigue siendo un desafío para la comunidad científica. Si bien se han identificado algunos factores de riesgo, como la exposición a radiación ionizante y ciertos síndromes genéticos, la causa exacta de la LLA en la mayoría de los casos permanece desconocida. Esta falta de conocimiento dificulta el desarrollo de estrategias de prevención y de tratamiento efectivas. En la búsqueda de factores que contribuyan al desarrollo de la LLA, la enzima arilamina N-acetiltransferasa 1 (NAT1) ha surgido como un candidato prometedor. Esta enzima, involucrada en la metabolización de fármacos, ha sido relacionada con diferentes tipos de cáncer. Su papel en la regulación del ciclo celular y la apoptosis la convierte en un factor de interés para comprender los mecanismos moleculares que subyacen a la LLA. En este contexto, el presente texto se propone explorar las características de los exosomas liberados por las células leucémicas los cuales pueden contener información sobre la enfermedad, niveles de expresión de proteínas y miRNAs. Esto los convierte en potenciales biomarcadores para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la LLA. A través de este trabajo de investigación científica y la presentación de datos relevantes, se busca contribuir al avance en la comprensión de la LLA.

Antecedentes

Leucemia linfoblástica aguda

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) se caracteriza por una proliferación masiva de glóbulos blancos y presencia de blastos en sangre los cuales presentan marcadores de baja madurez celular como CD34 y presencia de antígeno común de leucemia linfoblástica aguda llamado antígeno CALLA (CD10). La LLA es la principal causa de muerte por afecciones oncológicas en niños menores de 15 años y representa el 30% de todos los tipos de cáncer pediátrico en el mundo (Mejía-Aranguré, 2016). En México la tasa de incidencia es de 44.5 casos por cada millón de habitantes (Jiménez-Morales et al., 2017) y su etiología permanece poco conocida. Sin embargo, se han descrito factores genéticos, Síndrome de Down, Síndrome de Shwachman, Síndrome de Bloom, físicos, como las radiaciones ionizantes, exposición a pesticidas, benceno e infecciones virales (Bailey et al., 2015). Además, el riesgo de desarrollar LLA se asocia con el fenotipo de enzimas metabolizadoras de xenobióticos como la N-acetiltransferasa 1 (Hernández-González et al., 2018).

Arilamina N-Acetiltransferasa 1

La arilamina N-acetiltransferasa 1 (NAT, EC 2.3.1.5) es una enzima citosólica metabolizadora de fármacos, es una enzima citosólica involucrada en el metabolismo de fase II y en la biotransformación de fármacos. Esta enzima transfiere un grupo acetilo del acetil CoA a aminas aromáticas y heterocíclicas como el ácido-p-aminobenzoico (PABA) y el ácido p-aminosalicílico (PAS) (Jancova et al., 2010). NAT1 se encuentra expresada en células de hígado, vejiga, tejido mamario, próstata, pulmón, sistema digestivo y células sanguíneas de adultos. El gen NAT1 que codifica para la proteína NAT1 se encuentra ubicado en el cromosoma 8 (específicamente, NAT1 en 8p21.3-23.1). Sin embargo, se ha

descrito su papel en diferentes tipos de cánceres, al estar involucrada en la regulación del ciclo celular y la apoptosis (Carlisle et al., 2016). Esta enzima presenta diversos mecanismos de regulación como variantes genéticas, mediante el microRNA; miR-1290 (Endo et al., 2013a) y el RNA largo no codificante H19 (Sun et al., 2021).

NAT1 se ha asociado a cáncer debido a su papel regulador de la proteína p53 (L. Wang et al., 2018) así como de la acetil coenzima A y la coenzima A. Un aumento en la cantidad de acetil coenzima A promueve el crecimiento celular y la mitosis, mientras que una mayor cantidad de coenzima A favorece la apoptosis (Hernández-González et al., 2022).

RNA no codificante miRNAs y LncRNAs

Los microRNA (miRNA) son pequeños RNA no codificantes (RNA de 20 a 24 nucleótidos) que regulan la expresión de genes eucarióticos postranscripcionalmente mediante la degradación o inhibición de la traducción de sus RNA mensajeros (RNA mensajero) (Saliminejad et al., 2018). Los miRNAs han sido estudiados en cáncer, algunos se han asociado a la progresión de la enfermedad y otros se encuentran elevados o disminuidos (Smolarz et al., 2022). El miR-1290 regula la expresión de NAT1 a nivel de RNA mensajero y a nivel de proteína en cáncer de mama (Endo et al., 2013). En cambio, los LncRNA son moléculas de hasta 200 nucleótidos, que activan o reprimen factores de transcripción, transportando miRNAs o modificando la estructura del ADN y las histonas (Longley & Johnston, 2005). El largo no codificante LncRNA H19 media la metilación del promotor de NAT1 regulando su expresión a nivel de RNA mensajero y a nivel de proteína (Sun et al., 2022b). Este material genético no codificante puede empaquetarse en micro vesículas lipídicas y generar sus efectos en las células diana a distancia y actuar como mecanismos epigenéticos que participan en el desarrollo y progresión del cáncer.

Exosomas

Los exosomas son micro vesículas de 100 nm de diámetro que se generan por la vía del endosoma y contienen material genético en su carga exosomal y proteínas de superficie como las tetraspaninas (CD81, CD63 y CD9) (Zhou et al., 2016). Los exosomas se pueden encontrar en orina, saliva y suero y son un vehículo de transporte de material genético para evaluar los cambios en la célula de la que se originan y regular genes en su célula diana facilitando la comunicación célula-célula. Sin embargo, se desconoce la relación entre la presencia de miRNAs presentes en los exosomas y su implicación en la regulación de la expresión y actividad de NAT1. Por ello, en este proyecto se estudió las características de los exosomas de sangre periférica de pacientes con LLA y si contenían los miRNAs miR-1290, miR-26b, miR-126 y LncRNA H19 relacionados con regulación de NAT1.

Justificación

NAT1 es una enzima que participa en el metabolismo de fármacos, la cual se ha asociado con el desarrollo de leucemia linfoblástica aguda. Además, La enzima NAT1 puede regular el ciclo celular y la apoptosis, NAT1 a su vez es blanco de regulación por presencia de variantes genéticas y RNA no codificante (miRNAs y LncRNA), los cuales pueden estar contenidos en micro vesículas llamadas exosomas. Estos exosomas son liberados por las células leucémicas. Por lo tanto, es importante conocer si los exosomas liberados por estas células, contienen material genético que pueda regular a NAT1 específicamente los miRNAs miR-1290, miR-26b, miR-126 y LncRNA H19 relacionados con regulación de NAT1 y por ende generar cambios en las células diana de estos exosomas.

Hipótesis

Los exosomas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda contienen los miRNAs miR-1290, miR-26b, miR-126 y LncRNA H19 capaces de modificar la expresión génica y/o función de NAT1.

Objetivos

General

Determinar los miRNAs miR-1290, miR-26b, miR-126 y LncRNA H19 contenidos en exosomas provenientes de suero de pacientes con leucemia linfoblástica aguda que interfieren con la expresión y función de NAT1 y puedan usarse como posibles biomarcadores.

Específicos

1. Aislar y purificar los exosomas provenientes de suero de pacientes con leucemia linfoblástica aguda.
2. Caracterizar los exosomas provenientes de suero de pacientes con leucemia linfoblástica aguda mediante citometría de flujo multiparamétrica.
3. Evaluar mediante técnicas bioinformáticas los miRNAs y LncRNAs cuyo blanco sea NAT1.
4. Evaluar mediante RT-PCR la presencia de los miRNAs miR-1290, miR-26b, miR-126 y LncRNA H19 relacionados con regulación de NAT1 en los exosomas provenientes de suero de pacientes con leucemia linfoblástica aguda.

Material y métodos

Tipo de estudio

El estudio es observacional, exploratorio, piloto y transversal.

Universo de estudio

Muestras de sangre de un grupo control de 18 niños menores de 18 años, que no presentaron ningún tipo de neoplasia y un grupo de 13 niños con diagnóstico de LLA tipo B del Hospital Central "Dr Ignacio Morones Prieto", San Luis Potosí, SLP. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Central con número de registro 25-17. Los pacientes de LLA se clasificaron en diagnóstico reciente, bajo tratamiento y por el tipo de leucemia que cursaban (pre-B, pro-B, B Común).

Preparación de muestras

Las muestras de sangre se recolectaron a través de la vena ante cubital para los pacientes con LLA (n=13), durante el proceso de canalización en el área de oncología pediátrica del Hospital Central "Dr Ignacio Morones Prieto". Se permitió la coagulación de las muestras de sangre por 30 min a temperatura ambiente. Para eliminar los restos celulares, el sobrenadante se centrifugó a 3000 g por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió a aislar y purificar los exosomas mezclando 500 uL de suero libre de células con 126 uL del polímero Exoquick (System Biosciences, número de catálogo EXOQ5A-1) e incubar durante 30 min a 4°C. Se realizó un paso de centrifugación a 1500 g por 30 min a 4°C, seguido de otro a 12 000 g durante 2 min a 4°C para eliminar el sobrenadante. El sedimento de exosomas se resuspendieron en agua libre de nucleasas y se almacenaron a -80°C.

Caracterización física

El tamaño de partícula del exosoma y el potencial Zeta se realizaron utilizando el instrumento Zetasizer Nano ZS TM y el software Zeta Sizer versión 7.12 (Malvern Instruments, Reino Unido). El equipo está disponible en el Laboratorio de Biopolímeros y Nanoestructuras de la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP.

Citometría de flujo

Los exosomas se unieron a perlas magnéticas anti-CD81 (Thermofisher, número de catálogo: 10616D) durante la noche siguiendo las instrucciones del fabricante. Los complejos perlas-exosomas se tiñeron con anticuerpos monoclonales: anti-humano CD3-PE-Cy7 (número de catálogo: 560910, Clon SK7), anti-humano CD9-FITC (número de catálogo: 312103, Clon H19a), anti-humano CD10-APC (número de catálogo: 312209, Clon HI10a), anti-humano CD19-PE-Cy7 (número de catálogo: 560911, Clon SJ25C1), anti-humano CD34-PerCP (número de catálogo: 340430, Clon 8G12) y anti-humano CD63-Alexa Fluor 700 (número de catálogo: 353023, Clon H5C6) y se incubó 30 min a 4°C. Luego, el complejo perla-Exosoma se recolectó para analizar en el citómetro de flujo FACS Canto II con el software FACS DIVA (BD) y el software FlowJo V10.6.1 (BD).

Extracción de RNA exosomal

El RNA exosomal se aisló mediante la técnica de separación de fases con trizol-cloroformo. Se agregó reactivo TRIzol LS (500 µL) (Thermo Fisher Scientific, 10296-028) y cloroformo (200 µL) a cada muestra exosomal. Las muestras se mezclaron por agitación durante más de 30 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. La separación de fases se realizó mediante centrifugación a 12.000 g a 4°C durante 15 min, recibiendo la fase acuosa en 500 µL de isopropanol y dejando precipitar durante la noche a -80°C. Al día siguiente, se centrifugó durante 10 min a 12.000 g a 4°C, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de Etanol al 75%. Después de centrifugar durante 5 min a 7500xg a 4°C, se

descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet durante 5 min en hielo; se resuspendió en 20 µL de agua libre de nucleasas. La cantidad y calidad del RNA aislado se midió con el espectrofotómetro EPOCH. Los miRNAs miR-26b-5p, miR-126 y miR-1290 y LncRNA H19 se seleccionaron mediante técnicas bioinformáticas como posibles reguladores de NAT1 y se evaluó su presencia en el RNA exosomal mediante RT-PCR. El gen U6 se utilizó como control endógeno.

PCR de miRNAs y LncRNAs

Las secuencias de los cebadores se describen en la **Tabla 2**. El ADNc se ajustó a una concentración de 100 ng/µL. La amplificación por PCR y la lectura en tiempo real se realizó en un CFX96 Touch™ (Bio-Rad© Laboratories, Inc.). Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 95 °C durante 10 min para H19 y 3 min para U6, seguido de 45 ciclos a 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. No se ejecutó ningún control de plantilla sin ADNc en cada experimento para garantizar que no hubiera amplificación por ADN contaminante. La expresión relativa de cada gen se obtuvo utilizando el $2^{(-\Delta\Delta CT)}$.

Análisis estadístico

Se realizó análisis univariados para evaluar la distribución de cada variable, utilizando pruebas de normalidad y log-normalidad (Anderson-Darling, D'Agostino & Pearson; Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov). Las diferencias entre grupos se estimaron con una prueba T de Student o un ANOVA en datos paramétricos y una prueba U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis en casos de datos no paramétricos que requirieran comparaciones múltiples. Las variables dicotómicas o nominales se expresaron como frecuencias y porcentajes. Se utilizó el estadístico U de Mann-Whitney para analizar la diferencia en las variables antropométricas, clínicas y bioquímicas según el grupo de estudio. Se consideró un intervalo de confianza del 95% y un valor $p < 0,05$ con significancia estadística. Todos los análisis estadísticos se realizaron en GraphPad Prism 10.1.1., los gráficos utilizando R STUDIO 2024.04.2 Build 764, biblioteca ggplot 3.5.1 y el análisis PCA se realizó con la

Resultados

Se reclutaron 18 sujetos sanos y 13 pacientes con LLA. La mediana de edad de los sujetos fue de 8,2 años ($\pm 3,9$) y 8,9 años ($\pm 4,5$), respectivamente; la distribución por sexos para el grupo control fue de 12 niños y 6 niñas; para el grupo de LLA, fue de 8 varones y 5 mujeres. En el grupo de LLA, se encontró 3 pacientes clasificados como recidivantes en el momento del estudio y por EGIL se identificó Pro-B (B1), LLA común (B2) y LLA Pre-B (B3) siendo 2 sujetos, 8 sujetos y 3 sujetos, respectivamente. Además, los pacientes con LLA se clasificó según su régimen terapéutico; en aquellos pacientes si estaban bajo tratamiento o de diagnóstico reciente, siendo 9 sujetos en tratamiento y 4 de diagnóstico reciente. Las características clínicas y bioquímicas de la población de estudio se describen en la Tabla 1. Los sujetos con LLA presentaron un número significativamente mayor de glóbulos blancos, linfocitos, eritrocitos, hemoglobina y hematocrito en comparación con el grupo control (**Tabla 1**).

Los exosomas de pacientes con LLA son más grandes y menos complejo

Se evaluó el tamaño de partícula de los exosomas de pacientes con LLA y sujetos control, revelando un tamaño de partícula significativamente mayor en el grupo de pacientes con LLA ($p=0,0071$) en comparación con el grupo control (**Figura 1A**). El tamaño de partícula de los exosomas también se evaluó clasificando a los pacientes con LLA bajo la clasificación EGIL donde los pacientes con LLA independientemente de la clasificación EGIL mostraron un mayor tamaño de partícula de los exosomas en comparación con el grupo control (**Figura 2A**). Asimismo, se encontró un tamaño significativamente mayor de los exosomas para el grupo de pacientes en tratamiento respecto al grupo control ($p=0,0083$) (**Figura 3A**). La complejidad de los exosomas se evaluó con el potencial zeta, y se observó un potencial zeta significativamente mayor en el grupo de pacientes ($p=0,0014$)

(Figura 1B). El potencial zeta de los exosomas también se analizó en los pacientes con LLA según la clasificación EGIL, pero no se encontró diferencias entre los grupos **(Figura 2B)**. Además, se detectó un potencial zeta mayor tanto para el grupo de tratamiento como para el grupo de recién diagnóstico en comparación con el grupo control ($p=0,0095$) y ($p=0,0207$), respectivamente **(Figura 3B)**.

Tabla 1. Datos demograficos, antropométricos, clínicos y hematológicos de los sujetos de estudio

	<u>Control Group</u>	<u>ALL Group</u>	p
n	18	13	
Sex			
Male	12 (66.67%)	8 (61.54%)	-
Female	6 (33.33%)	5 (38.46%)	-
Age (years)	8.2 ± 3.9	8.9 ± 4.5	ns
Weight (Kg)	36.06 ± 17.88	38.05 ± 21.37	ns
Height (m)	1.14 ± 0.32	1.37 ± 0.29	ns
BMI (Kg/m2)	26.62 ± 3.30	22.43 ± 3.60 **	p=0.0022
Relapse			
No	NA	10 (76.93%)	-
Yes	NA	3 (23.07%)	-
EGIL			
ALL pro-B (B1)	NA	2 (15.4%)	-
ALL common(B2)	NA	8 (61.5%)	-
ALL pre-B (B3)	NA	3 (23.1%)	-
Condition			
Treatment	NA	9 (69.23%)	-
First Diagnosis	NA	4 (30.77)	-
Clinical Parameters			
White Blood Cells (K/uL)	5.18 ± 2.72	5.82 ± 1.17	ns
Lymphocytes (K/uL)	1.24 ± 0.60	2.67 ± 0.65 ***	p<0.0001
Monocytes (K/uL)	0.50 ± 0.19	0.44 ± 0.15	ns
Neutrophiles (K/uL)	2.68 ± 1.27	3.30 ± 2.60	ns
Erythrocytes (M/uL)	5.04 ± 0.32	3.87 ± 0.32 ***	p<0.0001
Hemoglobin (g/dL)	14.13 ± 0.78	12.31 ± 1.89 **	p=0.0047
Hematocrit (%)	40.61 ± 2.47	37.28 ± 6.42*	p=0.0367
Platelets (K/uL)	273 ± 67.23	314.8 ± 138.1	ns

Tabla 2. Secuencias de primers utilizadas para la RT-PCR.

TARGET	Primer	Secuencia
miR-1290	STEM LOOP	GTGTCGTCTAGCACAGGGTCCGTTGGTCCAGCTAAG GTACCTGTGCTAGACGCACTCCTG
	Cebador directo	CATGCAGTATGGATTTTTGGA
	Sonda	CTGTGCTAGACGCACTCCCTGA
miR-26b	STEM-LOOP	GTGTCGTCTAGCACAGGGTCCGTTGGTCCAGCTAAG GTACCTGTGCTAGACGACACCCTAT
	Cebador directo	CGAGCAGTATTCAAGTAATTC
	Sonda	TGTGCTAGACGACACACCTATCCT
miR-126	STEM-LOOP	GTGTCGTCTAGCACAGGGTCCGTTGGTCCAGCTAAG GTACCTGTGCTAGACG CACCGCGTA
	Cebador directo	GCATCGTTGTACATTACTTT
	Sonda	TGCTAGACGACACCGCGTACCA
LncRNA H19	Reverse	GCTTCACCTTCCAGAGCCGAT
	Forward	TCCGGCCTTCCTGAACACCT

Figura 1

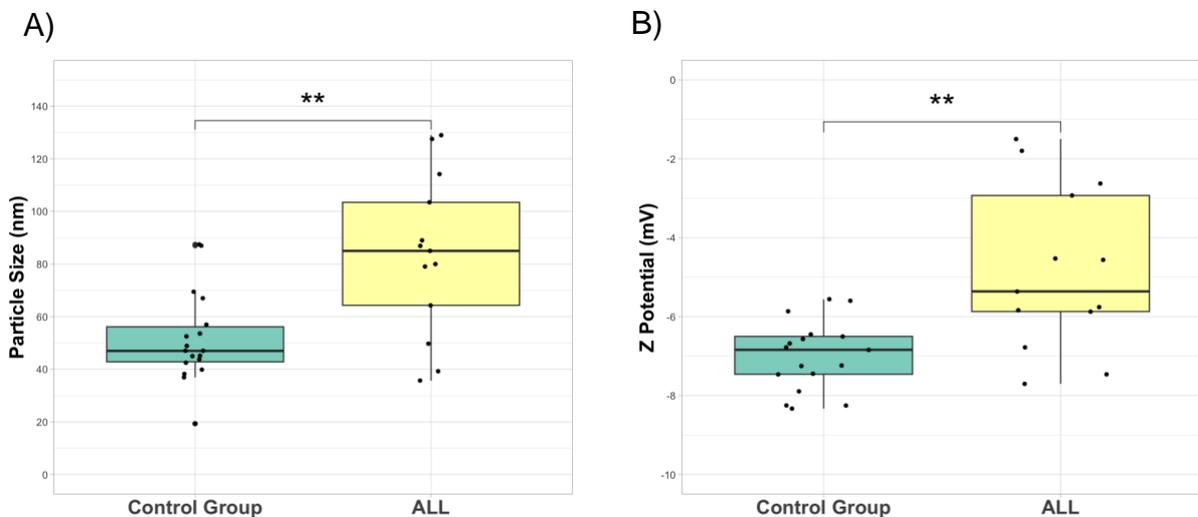


Figura 1. Caracterización física de los exosomas. (A) Tamaño de partícula en nanómetros (nm) para el grupo control y el grupo de LLA ($p=0,0071$ mediante la prueba U de Mann-Whitney). **(B)** Potencial zeta en milivoltios (mV) para el grupo control y el grupo de LLA ($p=0,0014$ mediante la prueba U de Mann-Whitney). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Los recuadros muestran los rangos intercuartílicos y las barras

representan los valores máximo y mínimo.

Figura 2

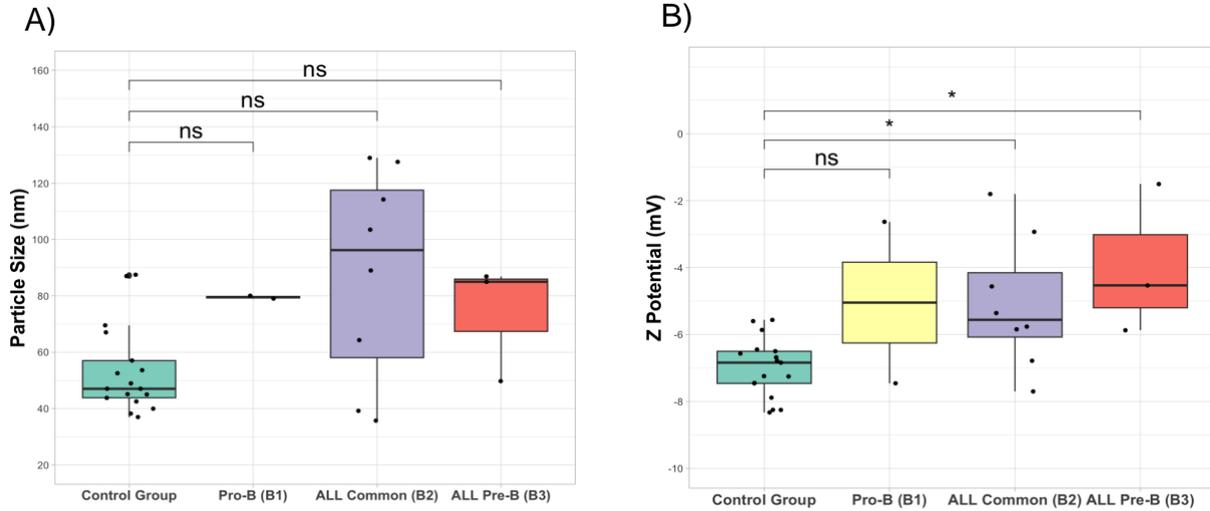


Figura 2. (A) Tamaño de partícula en nanómetros para los grupos clasificados por el Grupo Europeo para la Clasificación Inmunológica de las Leucemias (EGIL) ($p=0,184$ por Kruskal Wallis con comparaciones múltiples). **(B)** Potencial zeta en milivoltios (mV) para los grupos clasificados por el Grupo Europeo para la Clasificación Inmunológica de las Leucemias (EGIL) ($p=0,248$ mediante prueba de Kruskal Wallis con comparaciones múltiples). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Los recuadros muestran los rangos intercuartílicos y las barras representan los valores máximo y mínimo.

Figura 3

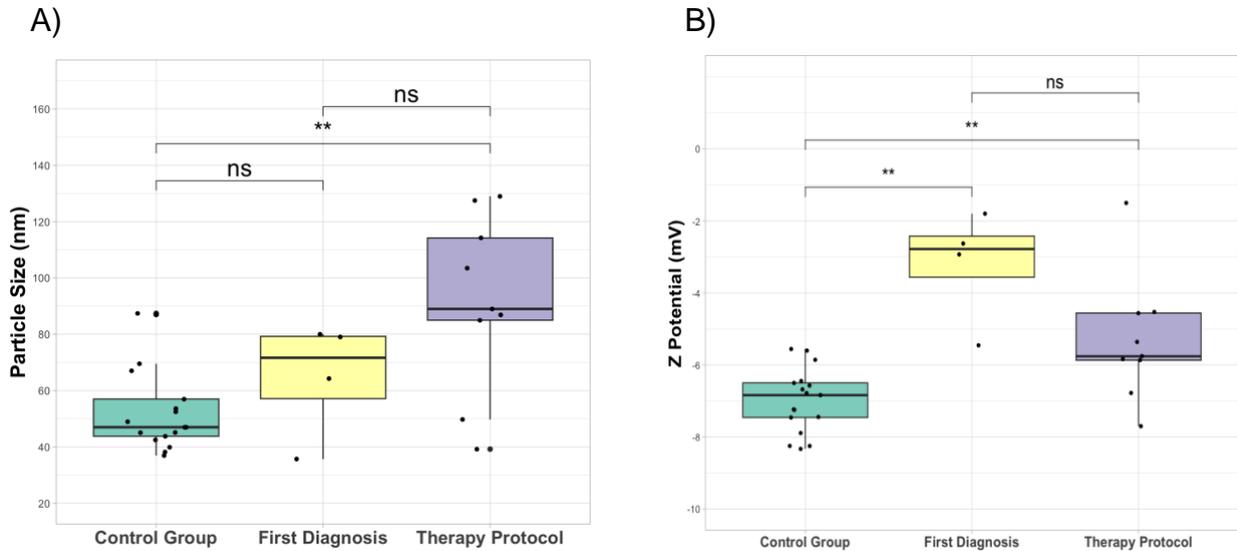


Figura 3. (A) Tamaño de partícula en nanómetros de los exosomas para los grupos clasificados por afección, tanto si estaban en tratamiento (Protocolo de Terapia) como si tenían un diagnóstico reciente o el primer diagnóstico en el momento del estudio ($p=0,0083$ para el Grupo Control frente al Protocolo de Terapia mediante Prueba de Kruskal Wallis con comparaciones múltiples). **(B)** Potencial zeta en milivoltios (mV) para los grupos clasificados por tratamiento (Protocolo de Terapia) o diagnóstico reciente en el momento del estudio ($p=0,0095$ para Grupo Control vs Protocolo de Terapia y $p=0,0207$ para Grupo Control vs Primer Diagnóstico mediante prueba de Kruskal Wallis con comparaciones múltiples). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Los recuadros muestran los rangos intercuartílicos y las barras representan los valores máximo y mínimo.

Los exosomas de pacientes con primer diagnóstico de LLA muestran diferente inmunofenotipo

Se evaluó la presencia de la tetraspanina CD9 y la integrina CD63, marcadores característicos de los exosomas, mediante citometría de flujo siguiendo la estrategia de análisis (**Figura 4**). Además, se evaluó la expresión de CD81, una tetraspanina presente en las perlas magnéticas utilizadas para la evaluación de los exosomas. Por lo tanto, los exosomas se caracterizaron como CD81+CD61+CD9+. Dado que los exosomas se generan a través de la vía endosomal utilizando la membrana plasmática de la célula, portan marcadores característicos de la célula que los liberó. Se evaluó CD3, un complejo multiprotéico que transmite señales a través del TCR al interior de la célula y que es característico de los linfocitos T así como CD19, una proteína transmembrana presente en los linfocitos B. Se observó que la expresión de exosomas CD81+CD61+CD9+ fue significativamente menor ($p=0,0001$) en el grupo de LLA respecto al grupo control (**Figura 5A**). Los niveles de CD81+CD63+CD3+ no mostraron diferencias entre los grupos (**Figura 5B**). Cuando se evaluó el marcador CD19, se detectó una disminución en el grupo de pacientes con LLA respecto al grupo control ($p=0,001$) (**Figura 5C**). Dado que los pacientes con LLA presentan blastos en circulación, y estos blastos son CD34+, una glicoproteína de membrana implicada en la adhesión, migración y diferenciación, se evaluó la expresión de este marcador para determinar si estas células pueden liberar exosomas. Dado que estas células tienen un bajo nivel de maduración, sería interesante investigar si se comunican con otras células a través de la vía de los exosomas. La presencia de moléculas CD81+ CD63+ CD34+ en los exosomas mostró un aumento significativo entre los grupos control y LLA ($p=0,0095$) (**Figura 5D**). Todos los exosomas que se analizaron son CD81+ por las perlas magnéticas CD81+ utilizadas por citometría de flujo.

Figura 4

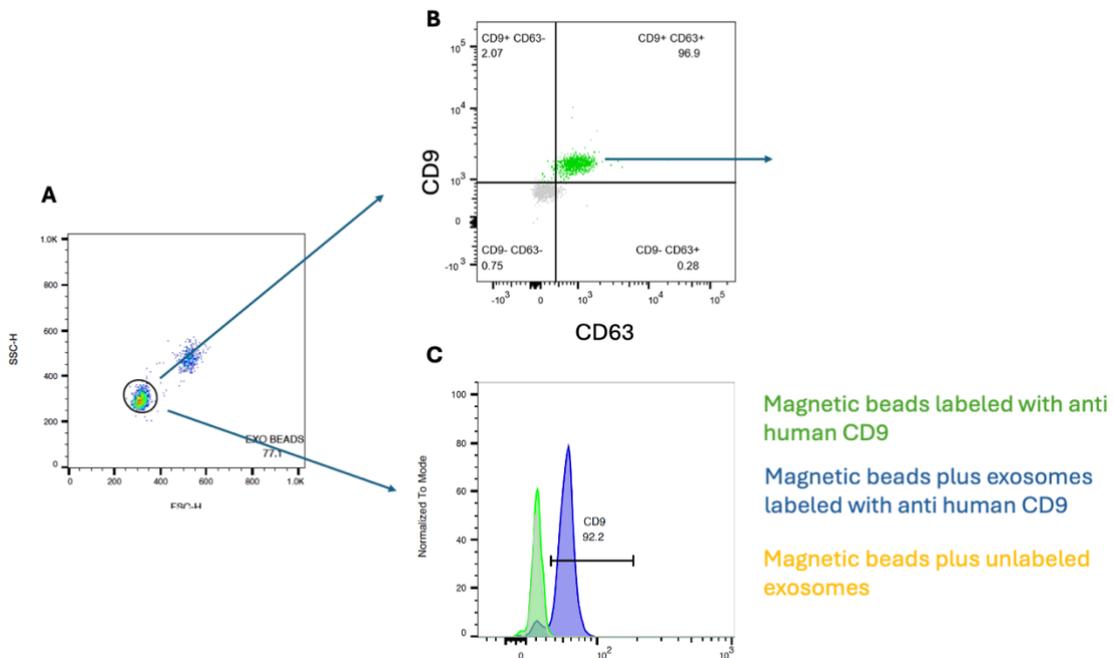


Figura 4. Estrategia de citometría de flujo para el inmunofenotipo de exosomas. **(A)** Estrategia experimental para determinar el tamaño y la complejidad de las perlas magnéticas acopladas a exosomas. **(B)** Estrategia para evaluar la expresión de CD9 y CD63 en los exosomas. **(C)** Histograma informativo sobre la especificidad de las microesferas magnéticas CD81+ CD63+ para unir exosomas CD9+.

Posteriormente, en el análisis de inmunofenotipo de los exosomas en los pacientes con LLA según clasificación EGIL, se observó una disminución en la expresión de exosomas CD81+CD63+ CD9+ entre el grupo control y los pacientes con leucemia Pro-B (B1) ($p=0,035$) y leucemia común en comparación con el grupo control (B2) ($p=0,0027$) (**Figura 6A**). Para los exosomas CD81+CD63+CD9+CD3+ se observó una disminución en la expresión de exosomas para el grupo de leucemia común (B2) ($p=0,039$) en comparación con el grupo control (**Figura 6B**). De igual forma los niveles de exosomas CD81+CD63+CD9+CD19+, son menores en el grupo de LLA común (B2) ($p=0,0003$) en comparación con el grupo control (**Figura 6C**). En contraste, Los niveles de exosomas CD81+CD63+CD9+CD34+ son mayores en el grupo de leucemia común (B2) ($p=0,025$) en comparación con el grupo control (**Figura 6D**).

Figura 5

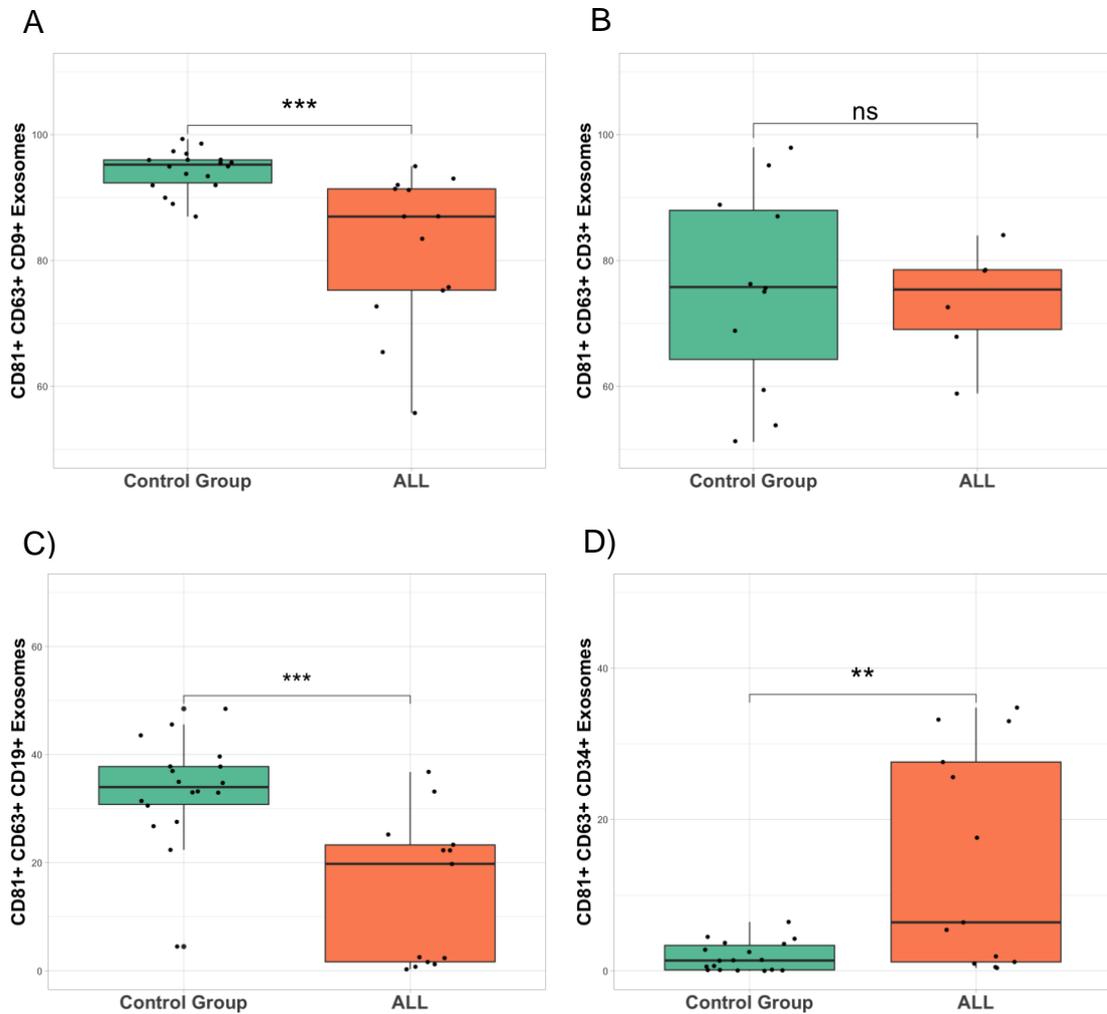


Figura 5. Inmunofenotipo de exomas para el grupo control y el grupo de LLA **(A)** Niveles de CD81+ CD63+ CD63+ CD9+ ($p=0,0001$). **(B)** Niveles de exomas CD81+ CD63+ CD63+ CD3+ ($p=0,3521$). **(C)** Niveles de exomas CD81+ CD63+ CD63+ CD19+ ($p=0,001$). **(D)** Niveles de exomas CD81+ CD63+ CD63+ CD34+ ($p=0,0095$). Todos los valores se establecieron mediante la prueba U de Mann-Whitney. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Los recuadros muestran los rangos intercuartílicos y las barras representan los valores máximo y mínimo.

Figura 6

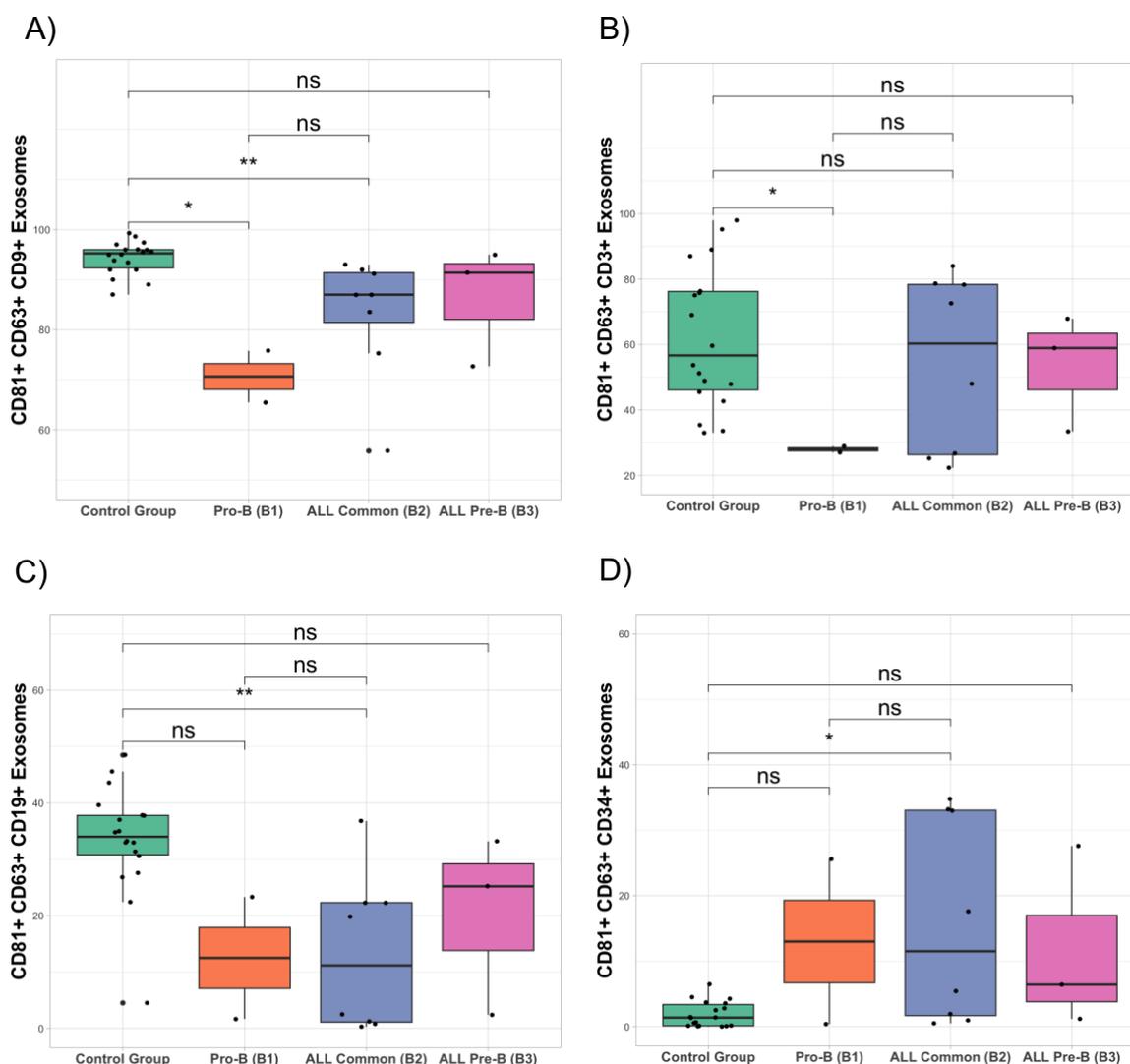


Figura 6. Inmunofenotipo de exomas para los grupos clasificados por el Grupo Europeo para la Clasificación Inmunológica de las Leucemias (EGIL). **(A)** Niveles de exomas CD81+ CD63+ CD63+ CD9+ ($p=0,0027$) para el grupo control frente a la LLA común (B2) y $p=0,0035$ para grupo control respecto LLA Pro-B (B1)). **(B)** Niveles de exomas CD81+ CD63+ CD63+ CD3+ ($p=0,039$) para el grupo control frente a la LLA común (B2). **(C)** Niveles de exomas CD81+ CD63+ CD63+ CD19+ ($p=0,0003$) para el grupo control frente a la LLA común (B2). **(D)** Niveles de exomas CD81+ CD63+ CD63+ CD34+ ($p=0,025$) para el grupo control frente a la LLA común (B2). Se utilizó la prueba de Kruskal Wallis con comparaciones

múltiples. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Los recuadros muestran los rangos intercuartílicos y las barras representan los valores máximo y mínimo.

Si los pacientes con LLA se encontraban bajo un régimen terapéutico o de recién diagnóstico se encontró una disminución significativa de los niveles de exosomas CD81+CD63+CD9+ ($p=0,0095$) y en la expresión de exosomas CD81+CD63+CD9+CD19+ en el grupo de tratamiento y en el grupo de diagnóstico reciente en comparación con el grupo control ($p = 0,0261$) y un aumento en la expresión de CD81+CD63+CD9+ del grupo con LLA que se encontraba bajo un régimen terapéutico respecto al grupo control ($p = 0,0315$) (**Figura 7A, 7C**). Del mismo modo, se observó una disminución de la expresión de exosomas CD81+CD63+CD9+CD3+ en el grupo de diagnóstico reciente en comparación con el grupo control ($p = 0,0095$) y respecto al grupo con LLA que se encontraba bajo un régimen terapéutico ($p = 0,0375$) (**Figura 7B**). En contraste, la expresión de CD81+CD63+CD9+CD34+, se encontró un aumento en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo control ($p < 0,0001$) (**Figura 7D**), sin diferencias con el grupo de nuevo diagnóstico.

Figura 7

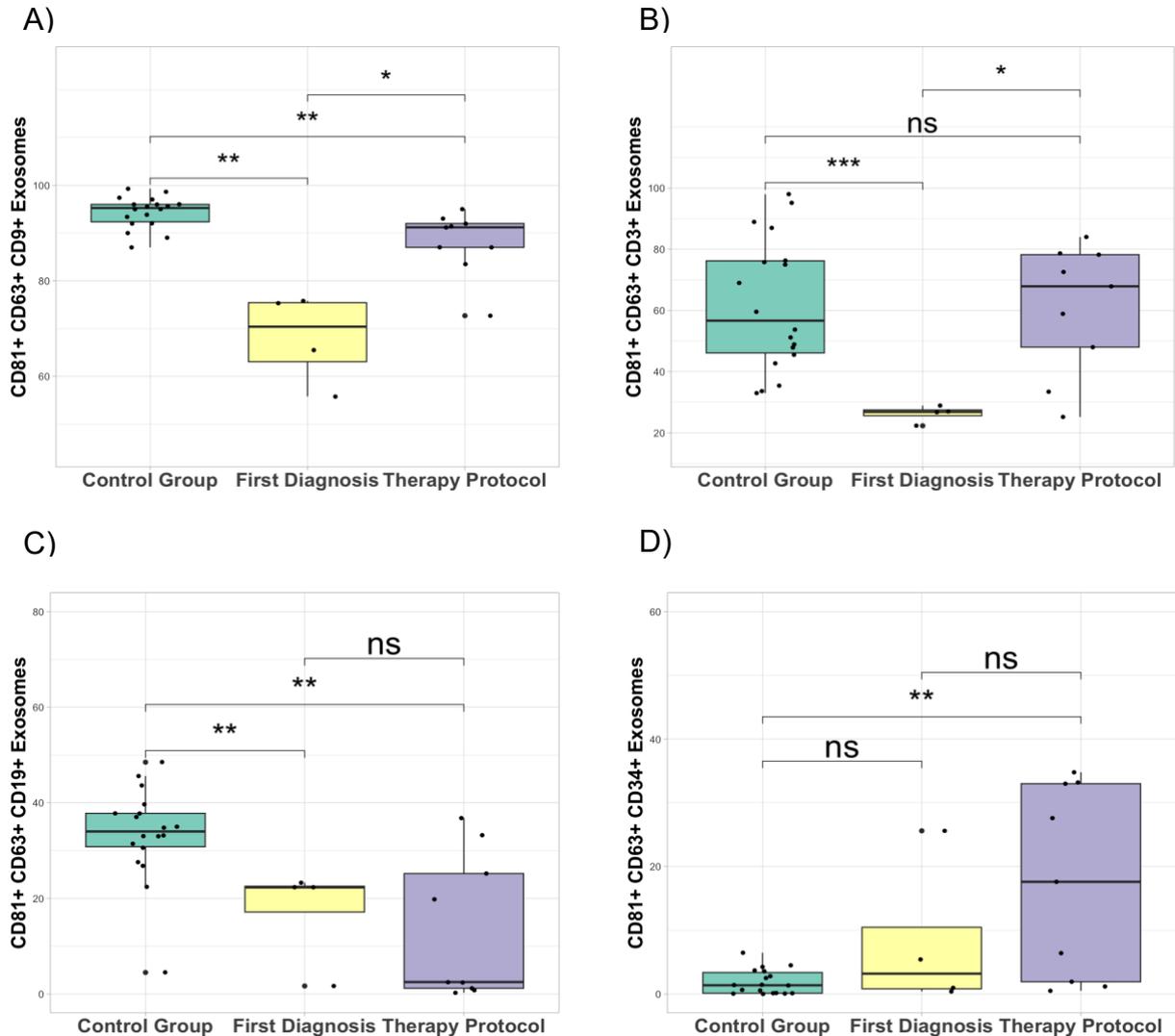


Figura 7. Inmunofenotipo de exomas para los pacientes clasificados por enfermedad (Protocolo de terapia o diagnóstico reciente/primer en el momento del estudio). **(A)** Niveles de exomas CD81+ CD63+ CD63+ CD9+ ($p=0,0095$ para el grupo control frente al protocolo terapéutico). **(B)** Niveles de exomas CD81+ CD63+ CD63+ CD3+ ($p=0,0062$ para el grupo control frente al protocolo de terapia y $p=0,0095$ para el grupo control frente al primer diagnóstico). **(C)** Niveles de exomas CD81+ CD63+ CD63+ CD19+ ($p=0,0001$ para el grupo control frente al protocolo de terapia y $p=0,0186$ para el grupo control frente al primer diagnóstico). **(D)** Niveles de exomas CD81+ CD63+ CD63+ CD34+ ($p=0,0001$ para el grupo control frente al protocolo terapéutico). Todo establecido Kruskal Wallis con

comparaciones múltiples). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Los recuadros muestran los rangos intercuartílicos y las barras representan los valores máximo y mínimo.

Dado que la metaloproteasa CD10 (antígeno CALLA), es el antígeno común de la LLA, se analizó en los exosomas aislados de pacientes y de controles. Para los exosomas CD81+CD63+CD10+, no se halló diferencias entre los grupos control y de LLA de forma independiente (**Figura 8A**). Si los pacientes con LLA se clasificaban con EGIL (**Figura 8B**) se encontró un aumento en los niveles de exosomas CD81+CD63+CD10+ en el grupo de leucemia común (B2) respecto al grupo control ($p = 0,0243$). Por otro lado, al clasificar a los pacientes con LLA por tratamiento o condición de primer diagnóstico, los niveles de exosomas CD81+CD63+CD10+ estaban elevados en los pacientes sometidos a tratamiento (**Figura 8C**) en comparación con el grupo de primer diagnóstico ($p = 0,0202$) y el grupo control ($p = 0,0032$). Se encontró una correlación positiva entre la expresión de CD9 y CD10 ($r = 0,578$, $p = 0,042$) solo en el grupo de LLA (**Figura 9B**).

Figura 8

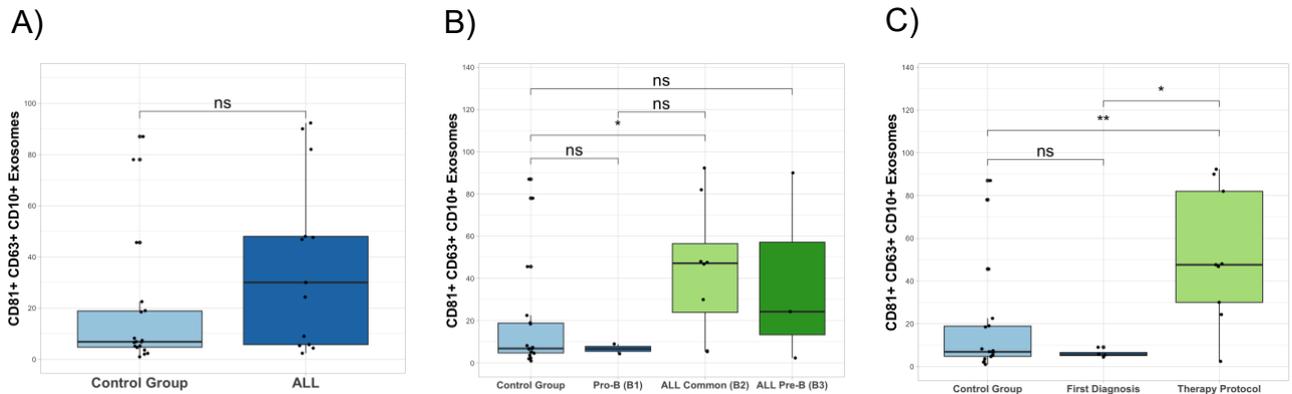


Figura 8. Inmunofenotipo de exomas, expresión de CD10. **(A)** Niveles de exomas CD81+ CD63+ CD63+ CD10+ para el grupo control y el grupo de LLA ($p=0,812$ mediante la prueba U de Mann-Whitney). **(B)** Niveles de exomas CD81+ CD63+ CD63+ CD10+ para los grupos clasificados por el Grupo Europeo para la Clasificación Inmunológica de la Leucemia (EGIL) ($p=0,0243$ para el grupo de leucemia común (B2) respecto al grupo control mediante prueba de Kruskal Wallis con comparaciones múltiples). **(C)** Niveles de exomas CD81+ CD63+ CD63+ CD10+ para los grupos tanto si estaban en Protocolo de Terapia o de diagnóstico reciente ($p = 0,0202$ para el Grupo Control frente al Protocolo de Terapia y $p=0.032$ para los pacientes sometidos a tratamiento respecto a el grupo control mediante Kruskal Wallis con comparaciones múltiples). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Los recuadros muestran los rangos intercuartílicos, y las barras representan los valores máximo y mínimo.

Figura 9

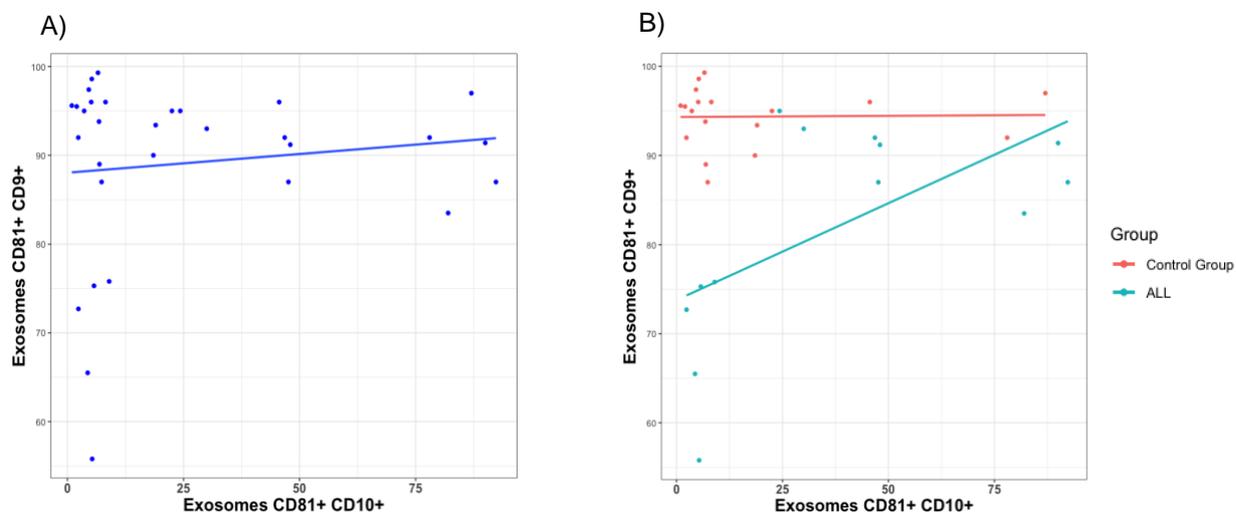


Figura 9. Correlación de la expresión de CD10 y CD9. (A) Correlación de CD10 y CD9 incluyendo datos de grupo control y de pacientes con LLA, ($r = -0,145$, $p = 0,566$ por Correlación de Spearman). (B) Correlación de CD10 y CD9 separado por grupos (Grupo control y LLA) para el grupo de LLA ($r = 0,578$, $p = 0,042$ por Correlación de Spearman).

Expresión de miRNAs exosomales

En un estudio previo de nuestro grupo de investigación, se evaluó mediante técnicas bioinformáticas los posibles miRNAs que podrían regular NAT1 (en proceso de publicación). Los miRNAs miR-26b, miR-126 y miR-1290 son conocidos por estar implicados en la proliferación, el ciclo celular y la apoptosis son los posibles reguladores de NAT1. Por lo tanto, se evaluó la presencia de estos miRNAs contenidos en la carga exosomal. Lo anterior, puede ser la base para dilucidar una posible vía reguladora para NAT1 en sujetos con LLA. Se observó una disminución de la expresión relativa de miR-26b en los pacientes con LLA ($p=0,007$) (**Figura 10A**) en comparación con el grupo control, esta diferencia se mantiene si

se divide a los pacientes por EGIL (**Figura 10B**) encontrando solo diferencia entre los grupos de LLA Pre-B (B3) ($p=0.0342$) y Común (B2) ($p=0.0391$) respecto al grupo control. Los pacientes con LLA mostraron una expresión significativamente menor de miR-26b, independientemente de que estuvieran en tratamiento ($p=0,0063$) o fueran de recién diagnóstico ($p=0,0146$) respecto al grupo control (**Figura 10C**).

Por otro lado, los niveles de miR-126 en los exosomas de los pacientes con LLA fueron significativamente menores respecto al grupo control ($p=0,0058$) (**Figura 10D**). Asimismo, al clasificar por EGIL o condición, no se encontró diferencias entre los grupos de estudio (**Figura 10E, 10F**). Los niveles de expresión de miR-1290 fueron similares entre los grupos control y LLA (**Figura 11A**) o si se clasifica el grupo por EGIL (**Figura 11B**). Aunque existe una tendencia a una mayor expresión en el grupo Pro-B (B1) en comparación con el grupo control, el reducido número de pacientes en esta condición podría limitar esta diferencia (**Figura 11B**). Interesantemente, se observó que los niveles de miR-1290 de los pacientes con un primer diagnóstico de LLA presentaron una expresión mayor de miR-1290 ($p=0,0079$) en comparación con el grupo control o con el grupo en tratamiento ($p=0,0169$) (**Figura 11C**).

Figura 10

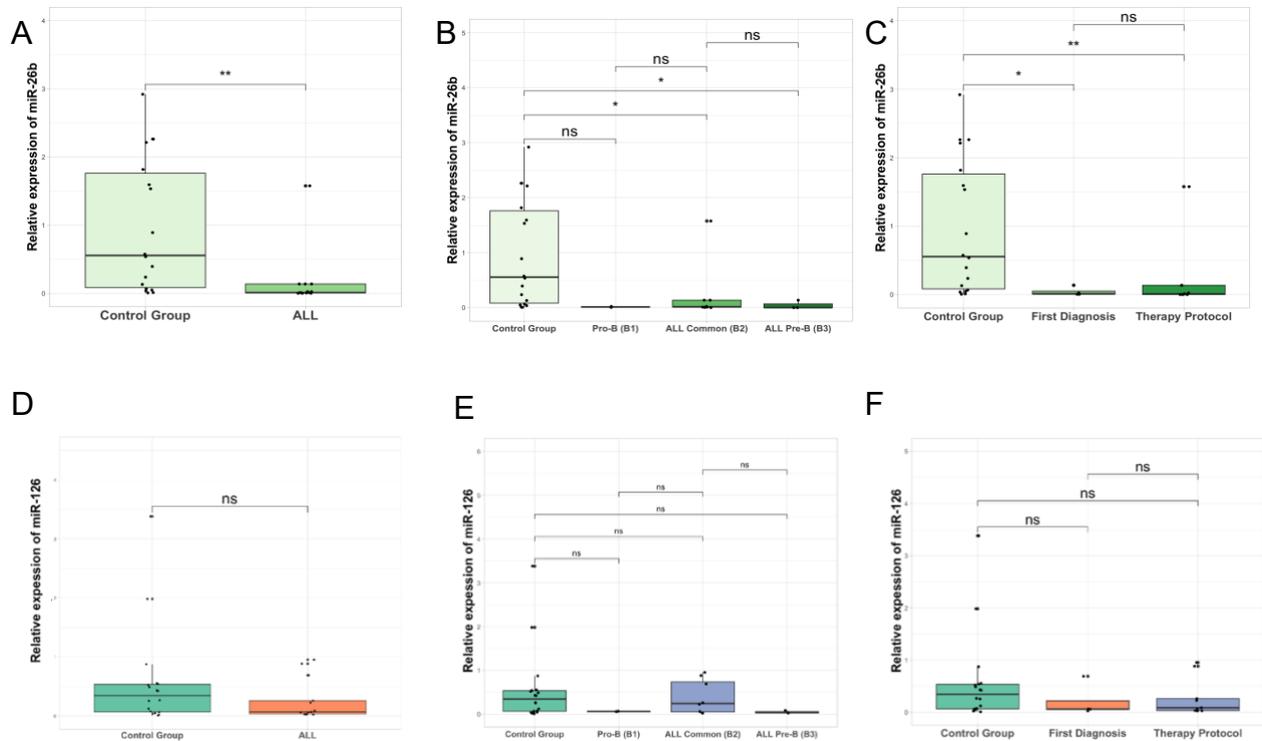


Figura 10. Expresión relativa de miR-26b, miR-126. **(A)** Expresión relativa de miR-26b en exosomas para el grupo control y el grupo de LLA ($p=0,007$ mediante la prueba U de Mann-Whitney). **(B)** Expresión relativa de miR-26b en exosomas para los grupos clasificados por el Grupo Europeo para la Clasificación Inmunológica de la Leucemia (EGIL) los grupos de LLA Pre-B (B3) ($p=0.0342$) y Común (B2) ($p=0.0391$) respect al grupo control. **(C)** Expresión relativa de miR-26b en exosomas para los grupos clasificados según su condición, tanto si estaban en tratamiento (Protocolo de Terapia) como si tenían un diagnóstico reciente o el primer diagnóstico en el momento del estudio ($p=0,0146$ para el Grupo Control frente al Protocolo de Terapia mediante Kruskal Wallis con comparaciones múltiples **(D)** Expresión relativa de miR-126 en exosomas para el grupo control y el grupo de LLA ($p=0,756$ mediante la prueba U de Mann-Whitney). **(E)** Expresión relativa de miR-126 en exosomas para los grupos clasificados por el Grupo Europeo para la Clasificación Inmunológica de la Leucemia (EGIL). **(F)** Expresión relativa de miR-126 en exosomas para los grupos clasificados según la enfermedad, tanto si

estaban en tratamiento (Protocolo de Terapia) o diagnóstico reciente. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Los recuadros muestran los rangos intercuartílicos y las barras representan los valores máximo y mínimo.

Figura 11

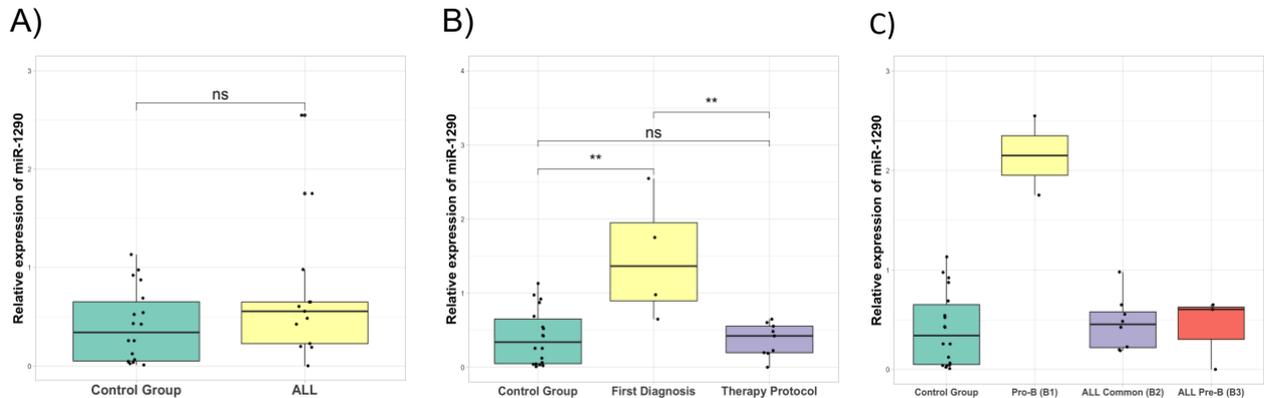


Figura 11. Expresión relativa de miR-1290 en exomas. **(A)** Expresión relativa de miR-1290 en exomas para el grupo control y el grupo de LLA **(B)** Expresión relativa de miR-1290 en exomas para los grupos clasificados por el Grupo Europeo para la Clasificación Inmunológica de la Leucemia (EGIL). **(C)** Expresión relativa de miR-1290 en exomas para los grupos clasificados según su condición, tanto si estaban en tratamiento (Protocolo de Terapia) como si tenían un diagnóstico reciente o primero en el momento del estudio ($p=0,0079$ para Grupo Control vs Protocolo de Terapia y $p=0,0169$ para Protocolo de Terapia vs Primer Diagnóstico mediante Kruskal Wallis con comparaciones múltiples). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Los recuadros muestran los rangos intercuartílicos y las barras representan los valores máximo y mínimo.

Expresión del LncRNA exosomal H19

El lncRNA H19 se ha estudiado por su papel en la proliferación celular, la metástasis, la invasión y la resistencia a la quimioterapia. También se ha implicado en la metilación del ADN, que regula la expresión génica. Recientemente, se ha

identificado como regulador de NAT1. Por lo tanto, se analizó la expresión de H19 en exosomas por su posible mecanismo regulador de NAT1 a través de la vía exosomal. Cuando se detectó la expresión de H19 en los exosomas, se observó un aumento significativo ($p=0,0299$) en el grupo con LLA en comparación con el grupo control (**Figura 12A**). Sin embargo, cuando se clasificó por EGIL, se encontró diferencias significativas entre el grupo de LLA común B2 y el grupo control ($p=0.0385$), y el grupo Pro-B (B1) respecto al grupo control ($p=0.0257$), Pro-B (B1) es el tipo de leucemia que muestra la mayor expresión relativa de H19, aunque no hay diferencias significativas con respecto a los otros subtipos de EGIL. (**Figura 12B**). Se detectó un aumento significativo de la expresión de H19 en los pacientes con el primer diagnóstico de LLA en comparación con el grupo control ($p=0,0386$) (**Figura 12C**).

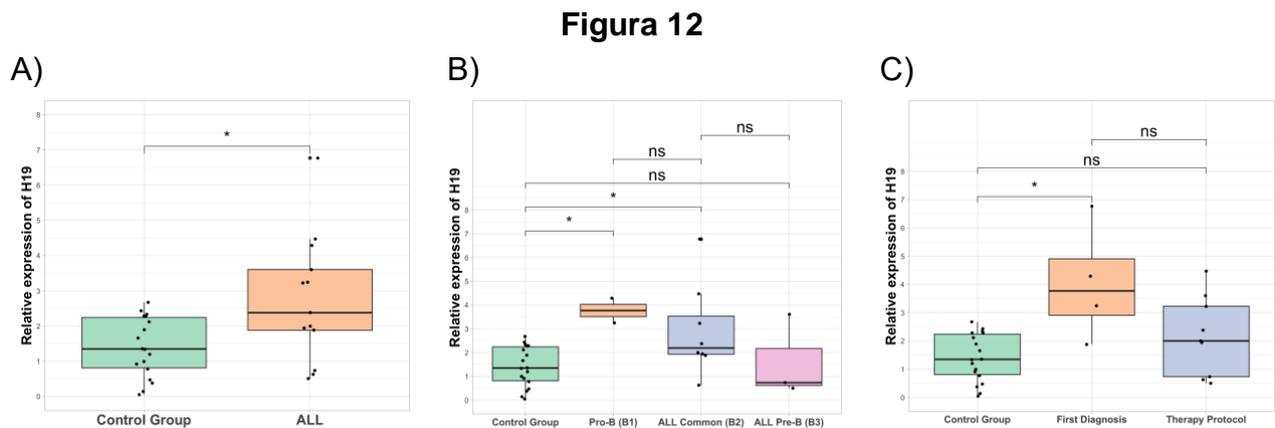


Figura 12. Expresión relativa del lncRNA H19. Expresión relativa del lncRNA H19. **(A)** Expresión relativa del lncRNA H19 en exosomas para el grupo control y el grupo de LLA ($p=0,0299$ mediante la prueba U de Mann-Whitney). **(B)** Expresión relativa del lncRNA H19 en exosomas para los grupos clasificados por el Grupo Europeo para la Clasificación Inmunológica de la Leucemia (EGIL). **(C)** Expresión relativa de lncRNA H19 en exosomas para los grupos clasificados por condición, ya sea que estuvieran bajo tratamiento (Protocolo de Terapia) o tuvieran un diagnóstico reciente o primero en el momento del estudio ($p=0.0385$ para Grupo Control vs Protocolo de Terapia por prueba de Kruskal Wallis con comparaciones múltiples). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Los recuadros muestran los rangos intercuartílicos, y las

barras representan los valores máximo y mínimo.

Análisis de componentes principales

Mediante este análisis se identificó los primeros componentes principales Dim1 (26,6%) y Dim2 (23,5%). Se detectó que el potencial Z, el tamaño de partícula, la expresión de CD10 y CD34 en los exosomas, la expresión relativa de H19 y la expresión relativa de miR-1290 explicaban mejor al grupo de pacientes con LLA, mientras que el grupo de sujetos control se explicaba mejor por los niveles de CD9+ y CD19 en los exosomas y la expresión relativa de miR-126 y miR-26b (**Figura 13**). Con la clasificación de los pacientes de primer diagnóstico o bajo tratamiento, se encontró que las variables de potencial Z, expresión relativa de H19 y expresión relativa de miR-1290 explican mejor el grupo de primer diagnóstico, ya que estas variables aumentan en los exosomas de los pacientes de primer diagnóstico. Para el grupo de LLA bajo tratamiento, las variables de tamaño de partícula, expresión de CD10 y CD34 en los exosomas explican mejor este grupo (**Figura 14**). Para los pacientes por subtipo de LLA mediante EGIL, no se identificó una variable que explicara mejor un subtipo de LLA en particular (**Figura 15**). Dado que se incluyó a 4 pacientes con recaída de LLA, se encontró que este grupo se explica mejor por las variables de tamaño de partícula y expresión de CD10 y CD34 en los exosomas, por lo que podría ser un posible biomarcador (**Figura 16**).

Figura 13

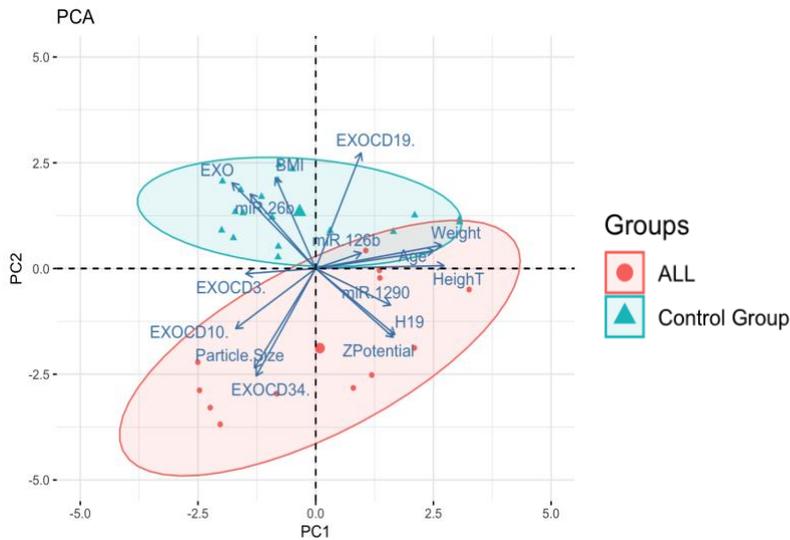


Figura 13. Análisis de componentes principales (PCA) categorizados por grupo control y grupo de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda. Los ejes muestran PC1 (26.6%) y PC2 (23.5%) de porcentaje de variación.

Figura 14

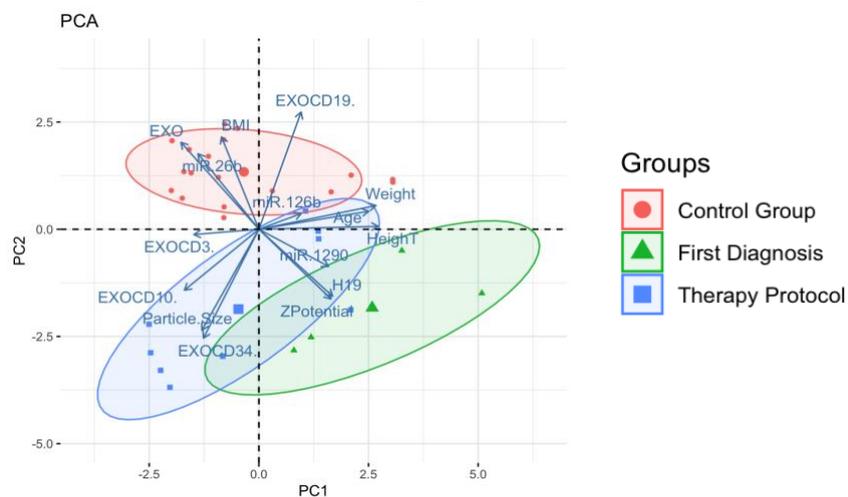


Figura 14. Análisis de componentes principales (PCA) categorizados por condición, ya sea que estuvieran bajo tratamiento (Protocolo de Terapia) o tuvieran un diagnóstico reciente o primero en el momento del estudio. Los ejes muestran PC1

(26.6%) y PC2 (23.5%) de porcentaje de variación.

Figura 15

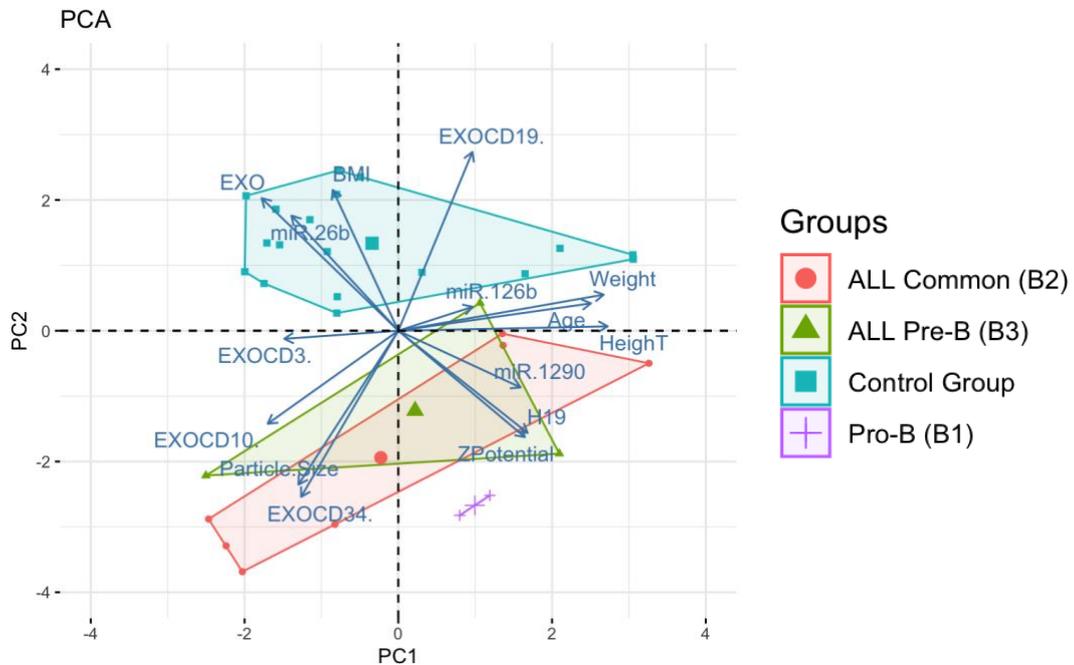


Figura 15. Análisis de componentes principales (PCA) categorizados grupos clasificados por el Grupo Europeo para la Clasificación Inmunológica de la Leucemia (EGIL). Los ejes muestran PC1 (26.6%) y PC2 (23.5%) de porcentaje de variación.

Figura 16

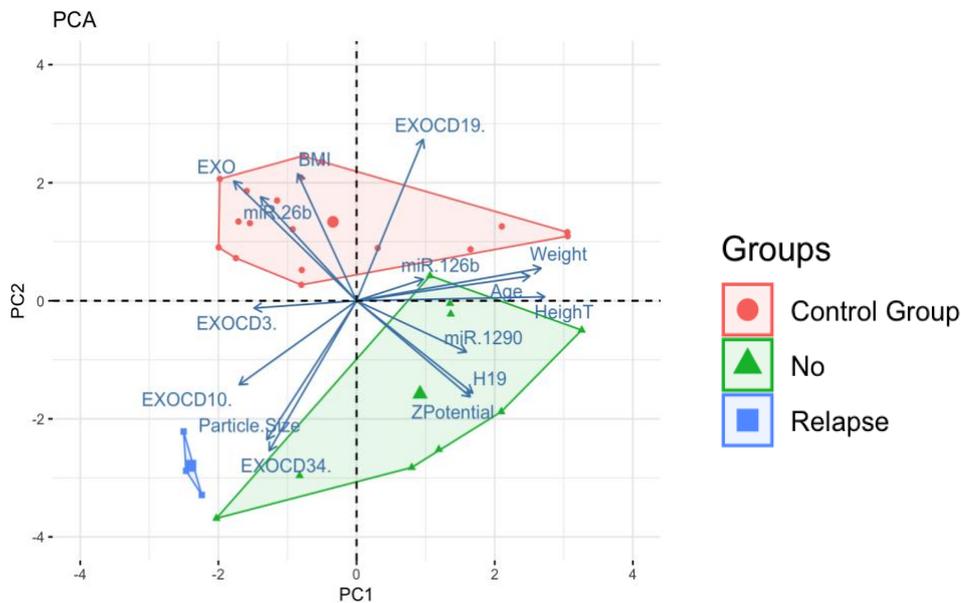


Figura 16. Análisis de componentes principales (PCA) Pacientes de Leucemia Linfoblástica Aguda clasificados por Recaída o No recaída. Los ejes muestran PC1 (26.6%) y PC2 (23.5%) de porcentaje de variación.

Correlación de las variables

El análisis de la correlación entre todas las variables del estudio mostró una correlación positiva entre los niveles de exosomas CD81+CD83+CD9+CD34+ y el tamaño de partícula ($r=0,79$) ($p<0,001$). También se logró observar una correlación negativa entre los exosomas CD81+CD83+CD9+CD34+ y los exosomas CD81+CD83+CD9+CD19+ ($r=-0,78$) ($p<0,001$) y una correlación negativa entre la cantidad de exosomas CD81+CD83+CD9+ y la expresión del LncRNA H19 ($r=-0,75$) ($p<0,001$). Además, se detectó una correlación negativa entre los niveles de eritrocitos y los niveles de exosomas CD81+CD63+CD9+ ($r=-0,56$) ($p<0,05$). Esto es significativo ya que se ha descrito que los exosomas participan en la maduración de los eritrocitos. También se detectó la correlación positiva entre miR-26b y el IMC

de los sujetos del estudio ($r=0,50$) ($p<0,05$) (**Figura 17**).

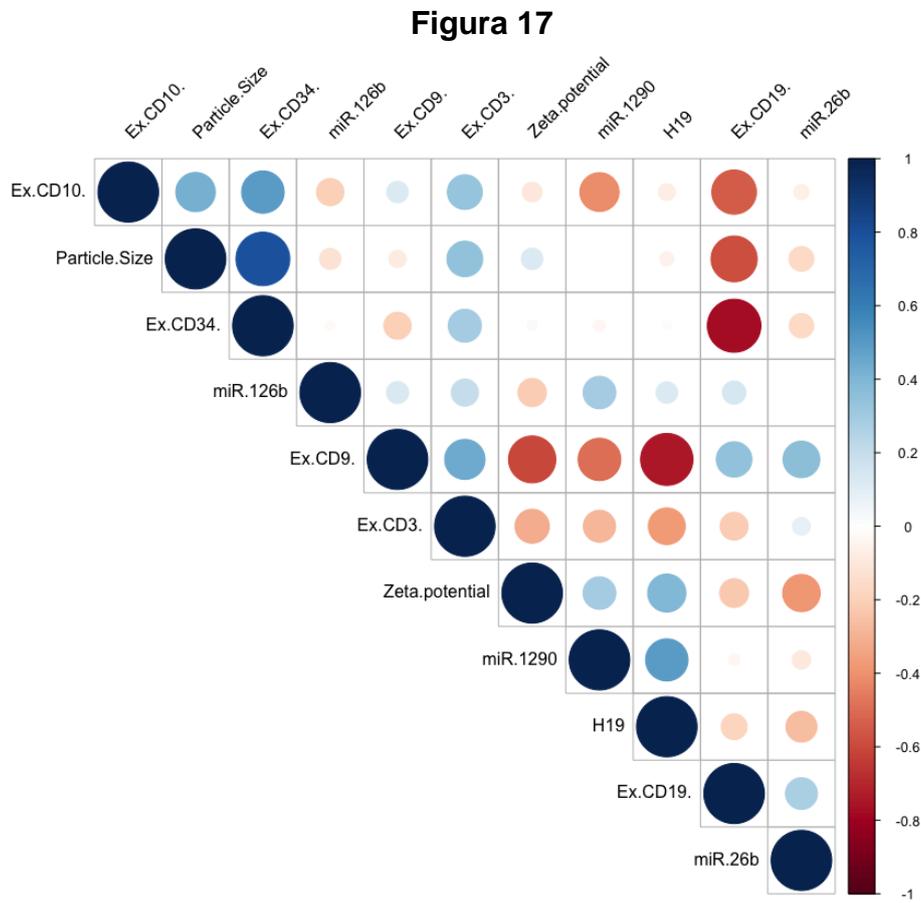


Figura 17. Matriz de correlación entre las variables del estudio. Todos establecidos por correlación de Spearman. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Discusión

Las causas del desarrollo de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) aún son desconocidas. Al respecto, la presencia de polimorfismos de un solo nucleótido de las enzimas NATs N-acetiltransferasas, en particular NAT1, se ha descrito como un posible factor de susceptibilidad a la LLA en población mexicana (Hernández-González et al., 2018). Además, NAT1 participa activamente en el ciclo celular, la proliferación y la generación de aductos de ADN (Carlisle et al., 2016). Por otro lado, NAT1 participa en enfermedades degenerativas crónicas, como la diabetes mellitus, y en enfermedades infecciosas destacando una posible contribución con el sistema inmune (Hernández-González et al., 2022). Datos de nuestro grupo de investigación además de identificar polimorfismos de NAT1 asociados con predisposición a LLA, se reportó niveles de expresión y función disminuidos en aquellos pacientes con un peor pronóstico. Por lo tanto, este estudio planteó el objetivo de determinar los miRNAs miR-1290, miR-26b, miR-126 y LncRNA H19 contenidos en exosomas provenientes de suero de pacientes con leucemia linfoblástica aguda que interfieren con la expresión y función de NAT1 y pudieran usarse como posibles biomarcadores.

El estudio incluyó una muestra de 18 sujetos sanos y 13 pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), con una mediana de edad similar en ambos grupos. La distribución por sexo fue comparable entre los grupos, lo que minimiza la posibilidad de sesgo de género en los resultados. Como era de esperar, los pacientes con LLA presentaron un número significativamente mayor de glóbulos blancos, linfocitos, eritrocitos, hemoglobina y hematocrito en comparación con el grupo control. Este hallazgo es consistente con la fisiopatología de la LLA, donde la proliferación descontrolada de células blásticas en la médula ósea puede conducir a un aumento en la producción de células sanguíneas (Terwilliger & Abdul-Hay, 2017) . Sin embargo, es importante tener en cuenta que algunos pacientes con LLA pueden presentar pancitopenia (disminución de las células sanguíneas) al momento del diagnóstico, especialmente aquellos con enfermedad avanzada o con infiltración de

la médula ósea (Inaba et al., 2013)

Los resultados muestran que los pacientes con LLA tienen un perfil hematológico alterado en comparación con los sujetos sanos, con niveles significativamente elevados de glóbulos blancos, linfocitos, eritrocitos, hemoglobina y hematocrito, reflejando la fisiopatología de la enfermedad. Las diferencias según subtipos EGIL (Pro-B, B común y Pre-B) y regímenes terapéuticos destacan la heterogeneidad de la LLA. Estos hallazgos coinciden con estudios previos que describen alteraciones hematológicas similares asociadas con proliferación maligna y reemplazo medular, subrayando su utilidad para la clasificación de riesgo y monitoreo clínico (Gökbuget et al., 2016).

Se caracterizó los exosomas de pacientes con LLA y sujetos sanos mediante el tamaño de las partículas. Estos valores corresponden a tamaños reportados de 30 a 100 nm (Zhou et al., 2016). De manera similar, el potencial zeta en los exosomas del grupo de estudio corresponde a lo que se ha reportado para este tipo de matriz, así como por el método de aislamiento exosomal utilizado (Martins et al., 2018). Es interesante resaltar que los exosomas del grupo con LLA mostraron un potencial zeta diferente, parámetro que puede indicar la complejidad de la membrana de estas micro vesículas. El potencial zeta se modifica dependiendo de los receptores o las proteínas de membrana que contengan. Las células leucémicas muestran diferentes patrones de expresión en lípidos de membrana y ácidos grasos C18:3n-6 y C20:6 (Agatha et al., 2001).

Los linfocitos de pacientes con LLA muestran diferentes patrones de expresión de fosfolípidos alquilados, lo que puede impactar en la resistencia a la quimioterapia (Hildebrand et al., 1975). Teniendo en cuenta que los exosomas se sintetizan a través de la vía del endosoma y usan estas membranas para formar su cubierta (Han et al., 2022), estos cambios en el potencial zeta podrían explicarse por diferencias en la composición lipídica de las membranas de las células leucémicas. Además, dado que las células leucémicas tienen un fenotipo distinto, esto podría explicar las diferencias en la complejidad de las membranas de los exosomas entre

los grupos de estudio.

Una parte importante de la LLA es que los niveles de blastos en sangre superan el 20%. Teniendo en cuenta que los exosomas se generan a través de la vía del endosoma y forman parte de la membrana plasmática de la célula, se evaluó los marcadores exosomales característicos CD9 y CD63, además de los marcadores celulares más importantes de los linfocitos. La expresión de CD3 nos identifica exosomas originados de linfocitos T, CD19 para exosomas provenientes de linfocitos B y CD34 para evaluar exosomas que podrían provenir de células con bajos niveles de madurez. La presencia de CD10 en los exosomas se estudió para determinar si este antígeno común de la leucemia, conocido como CALLA, puede ser transportado por exosomas. La expresión de CD10 en exosomas se ha encontrado en exosomas de líquido seminal mediante citometría de flujo, proponiéndose como un potente activador de la vía de coagulación extrínseca, junto con CD13, CD26 y TF (Franz et al., 2013). De manera similar, se ha reportado la expresión de CD10 en exosomas de orina de ratones, utilizándolo como biomarcador de daño hepático temprano (Conde-Vancells et al., 2010). Además, la presencia de CD10 en la superficie podría influir en la entrega de los exosomas a células específicas, así como modular la actividad de enzimas en el microambiente tumoral. En nuestro caso, evaluamos la presencia de CD10 en exosomas de pacientes con LLA y mediante el estudio de componentes principales, se propone que la expresión de CD10 en exosomas podría ser un posible biomarcador para la recaída, un aspecto importante en esta patología. No obstante, debemos aumentar el número de pacientes para poder atribuir con certeza esta característica, aunque abre una línea de investigación, ya que estos exosomas pueden encontrarse en fluidos corporales como la sangre o la saliva, facilitando un análisis no invasivo.

La molécula CD3 en los exosomas disminuyó en LLA, lo que puede deberse al bajo recuento de células en los pacientes con LLA o a cambios en la expresión de la membrana. Además, los pacientes con LLA con blastos sanguíneos pueden tener niveles bajos de madurez y aún no expresar CD3, ya que esta molécula sufre un

proceso de diferenciación en el timo hasta convertirse en células dobles positivas (CD4 y CD8). Los pacientes de recién diagnóstico también muestran una disminución significativa, teniendo un mayor número de blastos sanguíneos, a diferencia de los pacientes tratados, donde los linfocitos y los blastos sanguíneos se reducen significativamente. La baja expresión del marcador de linfocitos B, la molécula CD19 en los exosomas posiblemente sea el resultado de la quimioterapia. Esto se confirma por los niveles de exosomas CD81+CD63+CD9+CD19+ en pacientes con LLA de recién diagnóstico. De manera similar, los niveles de exosoma CD81+CD63+CD9+CD19+ en los grupos EGIL muestran los niveles más altos aunque no significativos en el grupo Pre-B (B3), que corresponde al tipo de célula más madura afectada por la leucemia.

La molécula CD34 es una glicoproteína que define a los progenitores hematopoyéticos (Stolpa et al., 2023) y se comprueba sus niveles altos en los exosomas CD81+CD63+CD9+CD34+ de los pacientes con LLA. Aunque los pacientes de recién diagnóstico muestran los niveles más bajos de estos exosomas en contraste a los pacientes bajo tratamiento con niveles más altos. Lo anterior, es contrario a lo que se espera, debido a los pacientes recién diagnosticados por encontrarse en las etapas iniciales de esta patología es cuando más niveles de blastos CD34 se encuentran en sangre. Sin embargo, La liberación de exomas no solo depende del número de células también puede depender del tipo de célula que los libera; las células tumorales tienden a liberar más exosomas, el estado celular; las células activadas o en condiciones de inflamación tienden a liberar más exosomas, el microambiente también juega un papel importante en la cantidad de exosomas liberados, así como estímulos internos y externos como el tratamiento (Shao et al., 2022).

En el caso de los niveles de CD10 detectados en los exosomas (CD81+CD63+CD9+CD10+) del grupo control, parecería un resultado contradictorio ya que se espera que CD10 este ausente en este grupo. Por otro lado, la tetraspanina CD9 puede unirse a la metaloproteasa CD10, por lo que se analizó la correlación entre estos dos marcadores en los exosomas de pacientes con LLA y el grupo control. La molécula CD10 es una endopeptidasa, la cual puede contribuir a la regulación de la activación de las células inmunes a través de su capacidad para degradar péptidos inflamatorios, como la endotelina, la bradicinina, la atriopeptina y la interleucina-1. Esta función enzimática es participe en la respuesta inmune y la modulación de la inflamación (Delikat et al., 1994). Por lo tanto, su presencia en los exosomas puede contribuir a la degradación de péptidos y hormonas específicos, alterando así el equilibrio de las señales biológicas (S. Wang et al., 2024). Al degradar ciertos péptidos inflamatorios, estos exosomas pueden modular la respuesta inmune localmente en el microambiente tumoral, contribuyendo a un entorno inmunosupresor que favorece la evasión inmune por parte de las células tumorales (Shipp et al., 1991). Además, una regresión lineal confirmó una correlación positiva entre CD9 y CD10, en el grupo de pacientes con LLA. Por lo tanto, no hay diferencias significativas entre los grupos de control y LLA o EGIL, y los pacientes en tratamiento muestran un patrón como el de la molécula CD34, con una expresión más alta en los pacientes tratados y una expresión más baja en los pacientes recién diagnosticados. Es importante señalar que un resultado de inmunofenotipo para LLA en un paciente recién diagnosticado mostró una expresión negativa de CD10, ya que algunos tipos de leucemia son aberrantes para ciertas moléculas (Gleissner et al., 2005). Lo que nos demuestra que es interesante continuar con la caracterización de los exosomas de pacientes y sujetos control.

El punto crucial de la comunicación de los exosomas es la carga que contienen, la cual incluye proteínas (enzimas, receptores) y material genético. Esto es importante ya que pueden contener RNA no codificantes como los miRNAs y lncRNAs, que pueden regular genes en la célula diana. Se evaluó miR-26b, un microRNA involucrado en proliferación celular, apoptosis y diferenciación. Se ha descrito como un supresor tumoral y un sensibilizador de células a la quimioterapia (Du et al., 2022;

Ma et al., 2021). Los exosomas de los pacientes con LLA muestran una expresión relativa menor de miR-26b, lo que indicaría una función supresora tumoral disminuida. Esto no se observa entre los grupos EGIL debido a la baja expresión en LLA en comparación con el grupo control. Además, los pacientes tratados y recién diagnosticados también mostraron una disminución, por lo que niveles bajos de miR-26b generalmente se encuentran en pacientes con LLA. El miR-126, un microRNA implicado en la angiogénesis, integridad vascular e inflamación, se reduce en ciertos tipos de cáncer, como el cáncer de mama y el colorrectal, donde puede inhibir el crecimiento tumoral y la angiogénesis (Kontarakis et al., 2018; Liu et al., 2019). Al evaluar la expresión relativa de miR-126, los grupos de estudio mostraron los mismos niveles de expresión. En cambio, miR-1290, un microRNA implicado en la proliferación celular, inhibición de la apoptosis, invasión, metástasis y la resistencia al tratamiento (Endo et al., 2013; Guz et al., 2022; Li & Li, 2022) puede regular la expresión de NAT1, como en el cáncer de mama. Nuestro grupo de investigación también ha descrito una correlación negativa entre la expresión de miR-1290 y los niveles y la actividad de la proteína NAT1 (Hernandez-Gonzalez et al., 2023). Al evaluar miR-1290 en exosomas, el grupo control y LLA mostraron niveles similares. Sin embargo, los pacientes de recién diagnóstico mostraron los niveles más altos de miR-1290. Esto sugiere que el miR-1290 podría tener un papel en las primeras etapas de la enfermedad y tener alguna asociación con el desarrollo de la leucemia linfoblástica aguda. Los niveles de miR-1290 disminuyen una vez que los pacientes se someten al tratamiento. Por lo tanto, los pacientes con LLA presentan niveles bajos de miR-26b y miR-126 y niveles altos de miR-1290. Nuestros resultados apuntan que este perfil de microRNAs evaluados se encuentran alterados y contribuir en la patogenia de la LLA. Los niveles más bajos de miR-26b disminuirían la función supresora tumoral, los niveles más bajos de miR-126 reducirían la inhibición del crecimiento tumoral y la expresión más alta de miR-1290 podría inhibir la apoptosis y aumentar la proliferación celular. Además, este miRNA puede regular la expresión de la proteína NAT1, lo que podría contribuir al desarrollo de la neoplasia, como se describió previamente, sin embargo, habrá que realizar análisis funcionales para describir este efecto de los exosomas liberados por las células leucemias sobre sus células diana, como cultivos de

células leucémicas con exosomas provenientes de células leucémicas.

Otra forma de regular los genes es a través de los lncRNA, que pueden actuar a través de varios mecanismos: pueden funcionar como esponjas de miRNA, unirse a factores de transcripción o regular la metilación de genes. El lncRNA H19 ha sido descrito como un regulador de NAT1 modificando los niveles de metilación de genes (Sun et al., 2021). En este estudio, encontramos una mayor expresión de H19 en pacientes con LLA, lo que puede indicar una regulación por este lncRNA en esta neoplasia. Los niveles de expresión fueron mayores en pacientes con un diagnóstico reciente, lo que sugiere que, de manera similar a miR-1290, H19 puede estar regulando NAT1 en las primeras etapas de la enfermedad. Sin embargo, se necesitan más estudios para verificar estos resultados.

Este estudio muestra las diferencias entre los exosomas de sujetos control y pacientes con LLA y cómo los exosomas podrían ser posibles biomarcadores de pacientes recién diagnosticados. Además, proporciona información para clasificar los exosomas usando marcadores de la célula que los libera. También proporciona información para NAT1, la cual puede ser modulada por la vía de los exosomas al contener miR-1290 y lncRNA H19 en su carga exosomal. Es importante señalar que estos hallazgos se basan en un tamaño de muestra pequeño y se necesita más investigación con cohortes más grandes, estudios longitudinales y una caracterización más detallada de los exosomas para validar y comprender completamente su papel en la LLA. Además, un análisis más detallado de los perfiles proteómicos, lipidómicos y transcriptómicos de los exosomas contribuiría a una comprensión más profunda de su composición y función en la LLA.

Conclusiones

Se logró aislar y caracterizar físicamente a los exosomas provenientes de pacientes con leucemia linfoblástica aguda, además de que se logró inmunofenotipificar a los exosomas, por otro lado, se logró encontrar la presencia de miR-1290, miR-26b, miR-126 y LncRNA H19. Estos resultados en conjunto revelaron las diferencias entre el tamaño, composición y material genético en los exosomas de pacientes con Leucemia linfoblástica aguda y sus subtipos, así como las diferencias entre los pacientes de primer diagnóstico y los pacientes que estaban bajo un régimen terapéutico. Estas diferencias sugieren posibles roles de los exosomas en las diferentes etapas de la progresión de la enfermedad y los distintos subtipos de LLA, así como un papel más activo en la comunicación y señalización celular, mediante una posible regulación a NAT1 y esta a su vez regulando el ciclo celular y apoptosis podría contribuir al desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, los exosomas de los pacientes recién diagnosticados podrían estar implicados en mecanismos diferentes de formación o liberación exosomal que deberán ser estudiados en próximas investigaciones buscando describir de una mejor forma estas diferencias entre los exosomas provenientes de leucemia linfoblástica aguda, con el fin de encontrar un biomarcador del desarrollo y pronóstico de la enfermedad que sea menos invasivo para este tipo de pacientes infantiles.

Bibliografía

- Agatha, G., Häfer, R., & Zintl, F. (2001). Fatty acid composition of lymphocyte membrane phospholipids in children with acute leukemia. *Cancer Letters*, *173*(2), 139–144. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00674-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00674-7)
- Bailey, H. D., Infante-Rivard, C., Metayer, C., Clavel, J., Lightfoot, T., Kaatsch, P., Roman, E., Magnani, C., Spector, L. G., Th. Petridou, E., Milne, E., Dockerty, J. D., Miligi, L., Armstrong, B. K., Rudant, J., Fritschi, L., Simpson, J., Zhang, L., Rondelli, R., ... Schüz, J. (2015). Home pesticide exposures and risk of childhood leukemia: Findings from the childhood leukemia international consortium. *International Journal of Cancer*, *137*(11), 2644–2663. <https://doi.org/10.1002/ijc.29631>
- Carlisle, S. M., Trainor, P. J., Yin, X., Doll, M. A., Stepp, M. W., States, J. C., Zhang, X., & Hein, D. W. (2016). Untargeted polar metabolomics of transformed MDA-MB-231 breast cancer cells expressing varying levels of human arylamine N-acetyltransferase 1. *Metabolomics*, *12*(7). <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1056-z>
- Conde-Vancells, J., Rodriguez-Suarez, E., Gonzalez, E., Berisa, A., Gil, D., Embade, N., Valle, M., Luka, Z., Elortza, F., Wagner, C., Lu, S. C., Mato, J. M., & Falcon-Perez, J. M. (2010). Candidate biomarkers in exosome-like vesicles purified from rat and mouse urine samples. *Proteomics - Clinical Applications*, *4*(4), 416–425. <https://doi.org/10.1002/prca.200900103>
- Delikat, S. E., Galvani David W, & Zuzel, M. (1994). A function of CD10 on bone marrow stroma. *British Journal of Haematology*, *87*, 655–657. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1994.tb08335.x>
- Du, Q., Yuan, Z., Huang, X., Huang, Y., Zhang, J., & Li, R. (2022). MiR-26b-5p suppresses chemoresistance in breast cancer by targeting serglycin. *Anti-Cancer Drugs*, *33*(3), 308–319. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000001268>
- Endo, Y., Toyama, T., Takahashi, S., Yoshimoto, N., Iwasa, M., Asano, T., Fujii, Y., & Yamashita, H. (2013a). MiR-1290 and its potential targets are associated with characteristics of estrogen receptor α -positive breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, *20*(1), 91–102. <https://doi.org/10.1530/ERC-12-0207>
- Endo, Y., Toyama, T., Takahashi, S., Yoshimoto, N., Iwasa, M., Asano, T., Fujii, Y., & Yamashita, H. (2013b). MiR-1290 and its potential targets are associated with characteristics of estrogen receptor α -positive breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*, *20*, 91–102. <https://doi.org/10.1530/ERC-12-0207>
- Franz, C., Böing, A. N., Hau, C. M., Montag, M., Strowitzki, T., Nieuwland, R., & Toth, B. (2013). Procoagulant tissue factor-exposing vesicles in human seminal fluid. *Journal of Reproductive Immunology*, *98*(1), 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2013.02.002>
- Gleissner, B., Goekbuget, N., Rieder, H., Arnold, R., Schwartz, S., Diedrich, H., Schoch, C., Heinze, B., Fonatsch, C., Bartram, C. R., Hoelzer, D., & Thiel, E.

- (2005). CD10- pre-B acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a distinct high-risk subgroup of adult ALL associated with a high frequency of MLL aberrations: Results of the German Multicenter Trials for Adult ALL (GMALL). *Blood*, *106*(13), 4054–4056. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-05-1866>
- Gökbuget, N., Dombret, H., Ribera, J. M., Fielding, A. K., Advani, A., Bassan, R., Chia, V., Doubek, M., Giebel, S., Hoelzer, D., Ifrah, N., Katz, A., Kelsh, M., Martinelli, G., Morgades, M., O'Brien, S., Rowe, J. M., Stieglmaier, J., Wadleigh, M., & Kantarjian, H. (2016). International reference analysis of outcomes in adults with B-precursor Ph-negative relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, *101*(12), 1524–1533. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.144311>
- Guz, M., Jeleniewicz, W., & Cybulski, M. (2022). An Insight into miR-1290: An Oncogenic miRNA with Diagnostic Potential. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1234. <https://doi.org/10.3390/ijms23031234>
- Han, Q. F., Li, W. J., Hu, K. S., Gao, J., Zhai, W. L., Yang, J. H., & Zhang, S. J. (2022). Exosome biogenesis: machinery, regulation, and therapeutic implications in cancer. *Molecular Cancer*, *21*(207). <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01671-0>
- Hernandez-Gonzalez, O., Del Carmen Milan-Segovia, R., Zavala-Reyes, D., Alvarado-Zamarripa, D. M., Ortiz-Zamudio, J. J., Correa-Gonzalez, L. C., Vargas-Morales, J. M., Uresti-Rivera, E. E., & Portales-Perez, D. P. (2023). Altered Arylamine N-acetyltransferase 1 and miR-1290 Levels in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Pilot Study. *In Vivo*, *37*(3), 1129–1144. <https://doi.org/10.21873/invivo.13188>
- Hernández-González, O., Herrera-Vargas, D. J., Martínez-Leija, M. E., Zavala-Reyes, D., & Portales-Pérez, D. P. (2022). The role of arylamine N-acetyltransferases in chronic degenerative diseases: Their possible function in the immune system. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1869*(9). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2022.119297>
- Hernández-González, O., Ortiz-Zamudio, J. J., Rodríguez-Pinal, C. J., Alvarado-Morales, I., Martínez-Jiménez, V. del C., Salazar-González, R. A., Correa-González, L. C., Gómez, R., Portales-Pérez, D. P., & Milán-Segovia, R. del C. (2018). Genetic polymorphisms of arylamine N-acetyltransferases 1 and 2 and the likelihood of developing pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, *59*(8), 1968–1975. <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1406090>
- Hildebrand, J., Marique, D., & Vanhouche, J. (1975). Lipid composition of plasma membranes from human leukemic lymphocytes. *Journal of Lipid Research*, *16*.
- Inaba, H., Greaves, M., & Mullighan, C. G. (2013). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, *381*(9881), 1943–1955. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62187-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62187-4)
- Jancova, P., Anzenbacher, P., & Anzenbacherova, E. (2010). PHASE II DRUG METABOLIZING ENZYMES. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, *154*(2), 103–116. <https://doi.org/10.5507/bp.2010.017>
- Jiménez-Morales, S., Hidalgo-Miranda, A., & Ramírez-Bello, J. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a genomic perspective. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de Mexico*, *74*(1), 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.bmhimx.2016.07.007>
- Kontarakis, Z., Rossi, A., Ramas, S., Dellinger, M. T., & Stainier, D. Y. R. (2018).

- Mir-126 is a conserved modulator of lymphatic development. *Developmental Biology*, 437(2), 120–130. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.03.006>
- Li, Y., & Li, X. (2022). miR-1290 modulates the radioresistance of triple-negative breast cancer by targeting NLRP3-mediated pyroptosis. *Clinical and Translational Oncology*, 24(9), 1764–1775. <https://doi.org/10.1007/s12094-022-02831-w>
- Liu, R., Zhang, Y.-S., Zhang, S., Cheng, Z.-M., Yu, J.-L., Zhou, S., & Song, J. (2019). MiR-126-3p suppresses the growth, migration and invasion of NSCLC via targeting CCR1. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23, 679–689. https://doi.org/10.26355/eurrev_201901_16881
- Longley, D. B., & Johnston, P. G. (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *Journal of Pathology*, 205(2), 275–292. <https://doi.org/10.1002/path.1706>
- Ma, S., Wei, H., Wang, C., Han, J., Chen, X., & Li, Y. (2021). MiR-26b-5p inhibits cell proliferation and EMT by targeting MYCBP in triple-negative breast cancer. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 26(1). <https://doi.org/10.1186/s11658-021-00288-3>
- Martins, T. S., Catita, J., Rosa, I. M., Da Cruz e Silva, O. A. B., & Henriques, A. G. (2018). Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches. *PLoS ONE*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198820>
- Mejía-Aranguré, J. M. (2016). *Etiology of Acute Leukemias in Children* (J. M. Mejía-Aranguré, Ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-05798-9>
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2018). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 1–15. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
- Shao, X., Hua, S., Feng, T., Ocansey, D. K. W., & Yin, L. (2022). Hypoxia-Regulated Tumor-Derived Exosomes and Tumor Progression: A Focus on Immune Evasion. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19). <https://doi.org/10.3390/ijms231911789>
- Shipp, M. A., Stefano, G. B., Switzer, S. N., Griffin, J. D., & Reinherz, E. L. (1991). CD10 (CALLA)/Neutral Endopeptidase 24.11 Modulates Inflammatory Peptide-Induced Changes in Neutrophil Morphology, Migration, and Adhesion Proteins and Is Itself Regulated by Neutrophil Activation. *Blood*, 78(7), 1834–1841.
- Smolarz, B., Durczyński, A., Romanowicz, H., Szyłto, K., & Hogendorf, P. (2022). miRNAs in Cancer (Review of Literature). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/IJMS23052805>
- Stolpa, W., Mizia-Malarz, A., Zapala, M., & Zwiernik, B. (2023). Can CD34+CD38– lymphoblasts, as likely leukemia stem cells, be a prognostic factor in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in children? *Frontiers in Pediatrics*, 11. <https://doi.org/10.3389/fped.2023.1213009>
- Sun, H., Wang, G., Cai, J., Wei, X., Zeng, Y., Peng, Y., & Zhuang, J. (2021a). Long non-coding RNA H19 mediates N-acetyltransferase 1 gene methylation in the development of tamoxifen resistance in breast cancer. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 23(1). <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10934>
- Sun, H., Wang, G., Cai, J., Wei, X., Zeng, Y., Peng, Y., & Zhuang, J. (2022b). Long non-coding RNA H19 mediates N-acetyltransferase 1 gene methylation in the development of tamoxifen resistance in breast cancer. *Experimental and*

- Therapeutic Medicine*, 23(1). <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10934>
- Terwilliger, T., & Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*, 7(6). <https://doi.org/10.1038/BCJ.2017.53>
- Wang, L. L., Minchin, R. F., & Butcher, N. J. (2018). Arylamine N-acetyltransferase 1 protects against reactive oxygen species during glucose starvation: Role in the regulation of p53 stability. *PLoS ONE*, 13(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193560>
- Wang, S., Xiao, Y., An, X., Luo, L., Gong, K., & Yu, D. (2024). A comprehensive review of the literature on CD10: its function, clinical application, and prospects. *Frontiers in Pharmacology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1336310>
- Zhou, J., Wang, S., Sun, K., & Chng, W.-J. (2016). The emerging roles of exosomes in leukemogenesis. *Oncotarget*, 7(31). www.impactjournals.com/oncotarget

Evaluación de microRNAs y IncRNAs exosomales involucrados en la regulación de NAT1 y su papel en leucemia linfoblástica aguda

INFORME DE ORIGINALIDAD

13%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Internet	143 palabras — 2%
2	patents.google.com Internet	105 palabras — 1%
3	www.jove.com Internet	88 palabras — 1%
4	www.news-medical.net Internet	87 palabras — 1%
5	docplayer.es Internet	70 palabras — 1%
6	www.fepafem.org.ve Internet	48 palabras — 1%
7	www.researchgate.net Internet	33 palabras — < 1%
8	Raquel Gil Piquer, Yolanda Mañes Jiménez, María España Marí, Anna Peris Peris et al. "Utilidad de la realidad virtual en el manejo del dolor asociado"	24 palabras — < 1%

Anexos

Altered Arylamine N-acetyltransferase 1 and miR-1290 Levels in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Pilot Study

OSWALDO HERNANDEZ-GONZALEZ^{1,2}, ROSA DEL CARMEN MILAN-SEGOVIA¹, DANIEL ZAVALA-REYES^{1,2},
DINORA MARGARITA ALVARADO-ZAMARRIPA^{1,2}, JUAN JOSE ORTIZ-ZAMUDIO³,
LOURDES CECILIA CORREA-GONZALEZ³, JUAN MANUEL VARGAS-MORALES¹,
EDITH ELENA URESTI-RIVERA^{1,2} and DIANA PATRICIA PORTALES-PEREZ^{1,2}

¹Faculty of Chemical Sciences, Autonomous University of San Luis Potosí, San Luis Potosí, SLP, Mexico;

²Research Center for Health Sciences and Biomedicine,

Autonomous University of San Luis Potosí, San Luis Potosí, SLP, Mexico;

³Hospital Central "Dr. Ignacio Morones Prieto", San Luis Potosí, SLP, México

Abstract. Background/Aim: Arylamine N-acetyltransferase 1 and 2 (NAT1 and NAT2) are drug-metabolizing enzymes that play a key role in the development of acute lymphoblastic leukemia (ALL). Materials and Methods: This study evaluated NAT1 and NAT2 mRNA and protein expression and their enzymatic activity in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with ALL (n=20) and healthy children (n=19) and explored the mechanisms that regulate these enzymes in ALL such as microRNAs (miR-1290, miR-26b) and SNPs. Results: PBMC from patients with ALL showed a decrease in NAT1 mRNA and protein expression. In addition, NAT1 enzymatic activity was decreased in patients with ALL. There was no influence of SNP 559 C>T or 560 G>A on low NAT1 activity. The lower expression of NAT1 might be related to the loss of acetylated histone H3K14 in the NAT1 gene promoter in patients with ALL and the higher relative expression of miR-1290 in the plasma of patients with relapsed ALL compared with healthy controls. There were significantly fewer CD3+/NAT1+

double-positive cells in patients who relapsed compared with control subjects. Based on a t-distributed stochastic neighbor embedding algorithm, CD19+ cells that reappeared in patients with relapse showed low NAT1 expression. In contrast, for NAT2, there were no significant results. Conclusion: The expression and function of NAT1 and miR-1290 levels could be involved in modulating immune cells altered in ALL.

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most frequent form of cancer diagnosed in pediatric patients and represents 25%-30% of all types of childhood cancer (1-3). In Mexico, this malignancy is the main cause of mortality in children from 5 to 14 years of age (4, 5), and it is estimated that 650-780 cases of ALL are detected per year. However, the biological mechanisms and etiology of this disease are not entirely clear. Several studies have shown that genetic (caused by a mixture of Indigenous and European heritage miscegenation) and lifestyle-related factors contribute to this disease significantly (1, 6). However, additional epigenetic modifications such as microRNAs (miRNAs), DNA methylation, or histone acetylation might participate (7).

Children are more susceptible than adults to developing ALL due to their physiological immaturity and exposure to chemical agents, annealing of meat foods, smoke pollutants, and parental smoking (8, 9). The compounds derived from this exposure are metabolically activated and generate carcinogenic metabolites. Phase 2 enzymes detoxify these metabolites or transform them into less potent compounds (3, 10). Therefore, alterations in these metabolic pathways, particularly in the enzymes associated with the metabolism of carcinogens, could lead to the accumulation of active carcinogenic metabolites that can increase the formation of DNA adducts and, consequently,

Correspondence to: Diana Patricia Portales-Perez, Faculty of Chemical Sciences, Autonomous University of San Luis Potosí, Manuel Nava 6, Zona Universitaria, 78210, San Luis Potosí, SLP, Mexico. Tel: +52 4448262300; ext: 8537or 6550, e-mail: dportale@uaslp.mx and Edith Elena Uresti-Rivera, Faculty of Chemical Sciences, Autonomous University of San Luis Potosí, Manuel Nava 6, Zona Universitaria, 78210, San Luis Potosí, SLP, Mexico. Tel: +52 4448262300; ext: 6550, e-mail: edith.uresti@uaslp.mx

Key Words: Arylamine N-acetyltransferases, microRNAs, acute lymphoblastic leukemia.



This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY-NC-ND) 4.0 international license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>).



Function and expression of N-acetyltransferases 1 and 2 are altered in lymphocytes in type 2 diabetes and obesity

Víctor Alejandro Paz-Rodríguez^a, Diana Judith Herrera-Vargas^a, Eneida Turiján-Espinoza^b, Miguel Ernesto Martínez-Leija^{a,b}, Emmanuel Rivera-López^d, Oswaldo Hernández-González^b, Daniel Zavala-Reyes^a, Mariana Haydee García-Hernández^e, Juan Manuel Vargas-Morales^b, Rosa del Carmen Milán-Segovia^c, Diana Patricia Portales-Pérez^{a,b,*}

^a Research Center for Health Sciences and Biomedicine, Autonomous University of San Luis Potosí (UASLP), Mexico

^b Laboratory of Immunology and Cellular and Molecular Biology, Faculty of Chemical Sciences, Autonomous University of San Luis Potosí, Mexico

^c Laboratory Biopharmacy, Faculty of Chemical Sciences, Autonomous University of San Luis Potosí, Mexico

^d Central Hospital "Dr. Ignacio Morones Prieto", San Luis Potosí, SLP, Mexico

^e Medical Research Unit-Zacatecas (UIMZ), Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS, Zacatecas, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

N-acetyltransferases
Diabetes
Obesity
Sirtuins
Metabolism

ABSTRACT

The cytosolic enzymes N-Acetyl Transferases 1 and 2 (NATs) transfer an acetyl group from acetyl-CoA to a xenobiotic substrate. NATs are regulated at the genetic and epigenetic levels by deacetylase enzymes such as sirtuins. The enzymatic expression of NAT1, NAT2, and SIRT1 was evaluated by flow cytometry, as well as the enzymatic activity of NATs by cell culture and HPLC analysis. Six SNPs were determined through genotyping. T2D patients (n = 29) and healthy subjects (n = 25) with a median age of 57 and 50, respectively, were recruited. An increased enzyme expression and a diminished NAT2 enzymatic activity were found in cells of T2D patients compared to the control group, while NAT1 was negatively correlated with body fat percentage and BMI. In contrast, Sirtuin inhibition increased NAT2 activity, while Sirtuin agonism decreased its activity in both groups. The analysis of NAT2 SNPs showed a higher frequency of rapid acetylation haplotypes in T2D patients compared to the control group, possibly associated as a risk factor for diabetes. The enzymatic expression of CD3+NAT2+ cells was higher in the rapid acetylators group compared to the slow acetylators group. The levels and activity of NAT1 were associated with total cholesterol and triglycerides. Meanwhile, CD3+NAT2+ cells and NAT2 activity levels were associated with HbA1c and glucose levels. The results indicate that NAT2 could be involved in metabolic processes related to the development of T2D, due to its association with glucose levels, HbA1c, and the altered SIRT-NAT axis. NAT1 may be involved with dyslipidaemias in people who are overweight or obese.

1. Introduction

Diabetes Mellitus (DM) is a group of metabolic disorders characterised by chronic hyperglycaemia and is due to defects in the secretion or action of insulin, or both. Type 2 diabetes (T2D), the most common form of DM, is a combination of an alteration of the beta cells of the pancreas and insulin resistance [1]. T2D affects around 463 million adults between 20 and 79 years of age (9.3 % of the world population in this age group) and has been associated with obesity [2].

Chronic low-grade inflammation due to lymphocyte infiltration, cytokine synthesis, and decreased regulatory T cells (Treg) is

characteristic of metabolic diseases such as T2D and obesity. Insulin resistance is a condition of the metabolic syndrome present in these conditions, generated by different factors, whether genetic, epigenetic, or cellular. Furthermore, there is an increase in proinflammatory subpopulations such as Th1, Th17, and Th2 in adipose tissue and the blood of patients with T2D [3]. The differentiation of T cells depends on different metabolic pathways: for the generation of effector T cells, pyruvate generated from glycolysis is required to be converted into lactate by the enzyme lactate dehydrogenase, while for Treg cells, pyruvate is required to enter the Krebs cycle in the mitochondria to generate Acetyl CoA by the enzyme pyruvate dehydrogenase (PDH). Enzymes that participate in the regulatory pathways of PDH are the

* Corresponding author. Translational and Molecular Medicine Department, Research Center for Health Sciences and Biomedicine, Autonomous University of San Luis Potosí, Mexico.

E-mail address: dportale@uaslp.mx (D.P. Portales-Pérez).

<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2024.101716>

Received 27 January 2024; Received in revised form 9 April 2024; Accepted 17 April 2024

2405-5808/© 2024 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).