



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA



RNAs NO CODIFICANTES COMO BIOMARCADORES EN EL DIAGNÓSTICO DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

TESINA

**PARA OBTENER EL GRADO DE
QUÍMICA FARMACOBIOLOGA**

**PRESENTA
ARACELI MORALES HERNÁNDEZ**

**ASESOR
DC CARLOS CORTÉS PENAGOS**

**CO-ASESOR
MC ERENDIRA SOLACHE HUACUZ**

MORELIA, MICHOACÁN, MAYO DE 2019

RESUMEN

Los RNAs no codificantes (ncRNA) son moléculas de RNA que no codifican para proteínas y tienen funciones de regulación epigenética. Estas moléculas se han encontrado desreguladas en diferentes tipos de cáncer, lo que podría indicar que su expresión podría estar directamente relacionada con la generación de éste. Entre los tipos de cáncer más común y con un mayor índice de mortalidad en niños, se encuentra la leucemia linfoblástica aguda (LLA), que se forma en los tejidos hematopoyéticos como lo son la médula ósea, la sangre periférica y los sitios extramedulares. El diagnóstico y el pronóstico de la LLA se realiza por medio de marcadores moleculares que se identifican en muestras de médula ósea, este examen suele ser extremadamente doloroso e invasivo; es por esto que es importante investigar nuevos marcadores moleculares que permitan dar un diagnóstico y un pronóstico de la enfermedad y que puedan ser estudiados causando el menor daño posible al paciente. Los ncRNAs se pueden extraer de fluidos como sangre periférica, orina y saliva, y se pueden detectar fácilmente con el uso de chips, lo que facilita su extracción e identificación respectivamente. Dentro de los ncRNAs se encuentran los micro RNA (miRNA) que tienen una longitud de aproximadamente 22 nucleótidos, los RNA que interaccionan con las proteínas de la familia piwi (piRNA) de entre 24 y 29 nucleótidos, y los RNA largos no codificantes (lncRNA) de al menos 200 nucleótidos. En esta revisión se pretende establecer el uso de los ncRNAs como marcadores pronósticos mediante la recopilación de información sobre los ncRNAs de los cuales, se ha reportado que su expresión anormal está relacionada con la generación de leucemia, entre los que se encuentran 21 miRNA y 1 lncRNA, los cuales se expresan de manera diferente dependiendo del tipo de LLA. Destacando el grupo miR~17-92 que tiene como blanco dos proteínas pro apoptóticas que al ser inhibidas, podrían generar el cáncer. Además, existen investigaciones que sugieren que los piRNA pueden estar altamente relacionados con la generación de leucemia debido a que se expresan en las células germinales de manera diferente en personas sanas, que en pacientes con cáncer. Todo esto en conjunto sugiere que los ncRNA pueden ser mejores blancos como marcadores diagnósticos y pronósticos que otro tipo de moléculas debido a la facilidad de su detección.

Palabras clave: miRNA, ncRNA, leucemia, desregulación, marcador.

ABSTRACT

The non-coding RNAs (ncRNA) are RNA molecules that do not code for proteins and have epigenetic regulation functions. These molecules have been deregulated in different types of cancer, which could indicate that their expression could be directly related to the generation of it. Among the most common types of cancer with a higher mortality rate in children, is acute lymphoblastic leukemia (ALL), which is formed in the hematopoietic tissues such as bone marrow, peripheral blood, and extramedullary sites. The diagnosis and prognosis of ALL is made through molecular markers that are identified in samples of bone marrow, this test is usually extremely painful and invasive; this is why it is important to investigate new molecular markers that allow a diagnosis and prognosis of the disease and that can be studied causing the least possible harm to the patient. The ncRNAs can be extracted from fluids such as peripheral blood, urine and saliva, and can be easily detected with the use of chips, which facilitates their extraction and identification respectively. Within the ncRNAs are microRNAs (miRNAs) that have a length of approximately 22 nucleotides, RNAs that interact with proteins of the piwi family (piRNA) of between 24 and 29 nucleotides, and long non-coding RNAs (lncRNA) of at least 200 nucleotides. In this review we intend to establish the use of ncRNAs as prognostic markers by gathering information about ncRNAs, which it has been reported that their abnormal expression is related to the generation of leukemia, including 21 miRNA and 1 lncRNA, which are expressed differently depending on the type of ALL. Highlighting the miR ~ 17-92 group that targets two pro-apoptotic proteins that, when inhibited, could cause cancer. In addition, there is research that suggests that piRNAs may be highly related to the generation of leukemia because they are expressed in germ cells differently in healthy people than in cancer patients. All this together suggests that ncRNAs may be better targets as diagnostic and prognostic markers than other types of molecules due to the ease of their detection.

Keywords: miRNA, ncRNA, leukemia, dysregulation, marker.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
GLOSARIO	V
1 INTRODUCCIÓN	9
1.1 Antecedentes	9
1.1 Definición del problema	10
1.2 Justificación	10
1.3 Objetivo general	11
1.4 Objetivos específicos	11
1.5 Hipótesis	11
2 MARCO TEÓRICO	12
2.1 Leucemia linfoblástica aguda	12
2.2 Marcadores moleculares en la leucemia linfoblástica aguda	13
2.3 RNAs no codificantes como marcadores moleculares en la leucemia linfoblástica aguda	16
2.4 Biogénesis de los microRNAs	19
2.4.1 Nomenclatura de los microRNAs	21
2.5 Biogénesis de los RNAs PIWI	21
2.6 MicroRNAs como marcadores moleculares en la leucemia linfoblástica aguda de las células B	22
2.6.1 MicroRNAs en leucemias BCR-ABL positivo	22
2.6.2 MicroRNAs en leucemias con reordenamiento de MLL	24
2.6.3 MicroRNAs en LLA-B con t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1	25
2.6.4 MicroRNAs en LLA-B con t(5;14)(q31.1;q32.3) IL3-IGH	26
2.7 MicroRNAs como marcadores en la leucemia linfoblástica aguda de las células T ..	26

2.7.1	MicroRNAs en leucemia precursora de linfocitos T tempranos	26
2.7.2	MicroRNAs en leucemia linfoblástica de células natural killer (NK)	28
2.8	RNAs largos no codificantes como biomarcadores en la leucemia linfoblástica aguda.....	28
2.9	Métodos de estudio de los rnas no codificantes	29
2.9.1	Muestras biológicas	29
2.9.2	Aislamiento de ncRNA.....	29
2.9.3	Métodos de cuantificación de los ncRNAs	29
3	RESULTADOS	31
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Biogénesis de los miRNAs.....	20
Figura 2	Vía de regulación del grupo miR-17~92.....	23

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.	Clasificación de la Leucemia Linfoblástica Aguda de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud.....	13
Tabla II.	Comparativa entre las características de miRNAs, piRNA y lncRNA.....	18
Tabla III.	RNAs no codificantes expresados en la Leucemia Linfoblástica Aguda.....	32
Tabla IV.	Micro RNAs en Leucemia Linfoblástica Aguda y otros tipos de cáncer.....	33

GLOSARIO

Alelo. Una de las varias formas alternativas de un gen que ocupa un determinado locus en un cromosoma.

Apoptosis. Muerte celular programada desencadenada por un estímulo celular a través de una vía de transducción de señales.

Cáncer. Nombre dado a las enfermedades en las que hay células anormales que se multiplican sin control y pueden invadir los tejidos cercanos.

Células B. Un linfocito que produce anticuerpos. Desarrollado principalmente en la médula ósea. Los linfocitos que emergen de la médula ósea experimentan una mayor diferenciación en el torrente sanguíneo y en los órganos linfoides periféricos.

Células T. Linfocitos del linaje T (tímico). Se diferencian en el timo de células madre de origen medular. Se agrupan en varios tipos funcionales (subconjuntos) según su fenotipo, principalmente la expresión de superficie CD4, CD8 o CD25. Diferentes subconjuntos están involucrados en diferentes respuestas inmunes mediadas por células.

Ciclinas. Las proteínas dependientes del ciclo celular que no tienen actividad enzimática intrínseca pero que se unen a una quinasa dependiente de ciclina inactiva que pueden activarla.

Cromosoma. Una unidad discreta del genoma que lleva muchos genes. Cada uno consta de una molécula muy larga de DNA dúplex y una masa de proteínas aproximadamente igual (en eucariotas). Es visible como una entidad morfológica solo durante la división celular.

Cromosoma Philadelphia (Ph). Translocación del cromosoma 22 en la que este recibe una parte del cromosoma 9.

Dicer. Una endonucleasa que procesa RNA precursor de doble cadena a moléculas de RNAi de 21 a 23 nucleótidos.

Drosha. Una endonucleasa que procesa los RNA primarios de doble cadena en precursores cortos (aproximadamente 70 pb) para el procesamiento de Dicer.

Epigenética. Cambios que influyen en el fenotipo sin alterar el genotipo. Consisten en cambios en las propiedades de una célula que se heredan pero que no representan un cambio en la información genética.

Horquilla. Una secuencia de RNA o DNA de cadena sencilla que puede plegarse sobre sí misma, formando ARN o DNA de doble cadena.

Leucemia. La palabra leucemia (*Leucämie*) significa “sangre blanca”, del griego *leuco*, λευκος: “blanca” y *emia*, αιμα: “sangre”. Cáncer que empieza en los tejidos que forman a la sangre, como la médula ósea, y que hace que se produzcan grandes cantidades de glóbulos anormales y estos entren en el torrente sanguíneo.

Leucemia linfoblástica aguda (LLA). Tipo de leucemia que se presenta de modo instantáneo y crece rápidamente. En la LLA, hay demasiados linfoblastos (glóbulos blancos inmaduros) en la sangre y la médula ósea.

Leucocito. Tipo de célula sanguínea que se produce en la médula ósea y que se encuentra en la sangre y los tejidos linfáticos. Los leucocitos son parte del sistema inmunitario del cuerpo. Estos ayudan al cuerpo a combatir infecciones y otras enfermedades. Los tipos de leucocito son los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), los monocitos y los linfocitos (células T y células B).

Linfoblasto. Célula inmadura que puede desarrollarse y llegar a ser un linfocito.

Locus. La posición en un cromosoma en el que reside el gen para un rasgo particular; puede estar ocupado por cualquiera de los alelos del gen.

Long non coding (lncRNA). Moléculas de RNA no codificantes conservadas evolutivamente que tienen más de 200 nucleótidos y están ubicadas dentro de los *loci* o regiones intergénicas que se superponen a transcripciones antisentido de genes codificantes de proteínas. Están involucrados en numerosas funciones celulares, incluida la regulación transcripcional, el procesamiento del RNA, la modificación del RNA y el silenciamiento epigenético. Recientemente se ha demostrado que desempeñan un papel importante en la orientación de la maquinaria de recombinación de cambio de clase.

Médula ósea. Tejido suave y esponjoso que se encuentra en el centro de la mayoría de los huesos. Produce los glóbulos blancos, glóbulos rojos y las plaquetas.

Microarreglo. Una serie de miles de diminutas muestras de oligonucleótidos de DNA impresas en un pequeño chip. Los mRNA se pueden hibridar con micromatrices para evaluar la cantidad y el nivel de expresión génica.

Micro RNA (miRNA). Pequeños (21 a 23 nucleótidos), RNA no codificantes conservados evolutivamente que funcionan en el silenciamiento de RNA y la regulación postranscripcional de la expresión génica. Se unen a secuencias complementarias dentro de la región no traducida 3' (UTR) de sus mRNA diana y regulan negativamente la expresión de proteínas acelerando la degradación del mRNA e inhibiendo la traducción del mRNA.

Neoplasia. Masa anormal de tejido que aparece cuando las células se multiplican más de lo debido o no se destruyen en el momento apropiado.

Oncogén. Un gen que cuando está mutado puede causar cáncer. La mutación es una ganancia dominante de mutación funcional.

PCR en tiempo real (rt-PCR). Técnica con monitoreo continuo de la formación del producto a medida que avanza el proceso, generalmente a través de métodos fluorométricos. También conocido como PCR cuantitativa (qPCR). No debe confundirse con la PCR de transcripción inversa (RT-PCR), que es un método que permite la detección de RNA por PCR.

PIWI interacting RNA (piRNA). Los piRNAs son una gran clase de RNA no codificante (ncRNA), de 26 a 31 nucleótidos de longitud, que interactúan con las proteínas que contienen el dominio piwi. Los piRNA funcionan en la línea germinal para silenciar elementos genéticos como los retrotransposones y en el silenciamiento de RNA como componentes del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC).

Proto-oncogén. Los genes que codifican elementos de la vía de transducción de señales que cuando se modifican pueden causar cáncer.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Un proceso para la amplificación de una sección de ácido nucleico definida a través de ciclos térmicos repetidos de desnaturalización, recocimiento y extensión de la polimerasa.

Represión. La capacidad de prevenir la síntesis de ciertas enzimas cuando sus productos están presentes; más en general, se refiere a la inhibición de la transcripción (o traducción) mediante la unión de la proteína represora a un sitio específico en el DNA (o mRNA).

Retrotransposón. Un transposón que se moviliza a través de una forma de RNA; El elemento de DNA se transcribe en RNA y, a continuación, se transcribe de forma inversa en DNA, que se inserta en un nuevo sitio en el genoma. No tiene una forma infecciosa (viral).

RISC. Complejo de silenciamiento inducido por RNA, una partícula de ribonucleoproteína compuesta por un siRNA corto y monocatenario y una nucleasa que escinde los mRNA complementarios al siRNA. Recibe el siRNA de Dicer y lo entrega al mRNA.

RNA de interferencia (RNAi). Un proceso por el cual los RNA cortos antisentido de 21 a 23 nucleótidos, derivados de ARN bicatenarios más largos, pueden modular la expresión de mRNA por inhibición o degradación de la traducción.

RNA mensajero (mRNA). El mRNA tiene la información genética que se necesita para elaborar proteínas y lleva esta información desde el DNA en el núcleo de la célula hasta el citoplasma donde se traduce a proteínas.

RNAs no codificantes (ncRNAs). RNA que no contiene un marco de lectura abierto.

Sangre. Tejido compuesto de glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas y otras sustancias suspendidas en un líquido que se llama plasma. La sangre lleva oxígeno y nutrientes a los tejidos y elimina los desechos.

siRNA. Corto RNA interferente, un miRNA que previene la expresión de genes.

Silenciamiento de RNA. La capacidad de un RNA, especialmente ncRNA, para alterar la estructura de la cromatina para prevenir la transcripción de genes.

Supresor de tumor. Una clase de proteínas que protegen el ciclo celular, asegurando que se cumplan los criterios de tamaño de la célula y ausencia de daños en el DNA. Estas proteínas actúan como frenos en el ciclo celular, impidiendo que la célula progrese de G1 a S.

Translocación. (1) El movimiento del ribosoma un codón a lo largo del mRNA después de la adición de cada aminoácido a la cadena polipeptídica. (2) El intercambio recíproco o no recíproco de material cromosómico entre cromosomas no homólogos.

Transposón. Una secuencia de DNA capaz de insertarse (o una copia de sí misma) en una nueva ubicación en el genoma sin tener ninguna relación de secuencia con el locus objetivo.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES

Durante muchos años las proteínas fueron consideradas como el principal producto final funcional de la información genética, aunque los genes que las codifican representan menos del 2% del genoma (Anastasiadou, *et al.*, 2017). Los avances en tecnologías de secuenciación permitieron el descubrimiento de varias especies de RNAs no codificantes (ncRNA) altamente conservados, entre los que se encuentran los micro RNAs (miRNA), los RNAs que interaccionan con las proteínas de la familia piwi (piRNA) y los RNAs largos no codificantes (lncRNA). Los miRNAs además de sus funciones regulatorias, también interactúan funcionalmente con otras especies de ncRNAs, tales como los lncRNAs, para regular su estabilidad. Por otro lado, los lncRNAs también regulan la abundancia disponible de miRNAs mediante mecanismos como el secuestro de éstos. Las altamente complejas interacciones de estos ncRNAs respaldan su rol como reguladores clave en importantes programas celulares. Las perturbaciones de estas interacciones aumentan el efecto sobre el control y modifican el destino de las células haciendo más común su transformación (Anastasiadou, *et al.*, 2017).

Los miRNAs y los lncRNAs se han identificado con expresión anormal en diferentes tipos de cáncer, por lo que se han relacionado con el origen de éste y se han propuesto como nuevos marcadores moleculares (Huang, *et al.*, 2013). Entre los tipos de cáncer más comunes en niños se encuentra la leucemia linfoblástica aguda (LLA), que se forma en los tejidos hematopoyéticos como son la médula ósea y los sitios extramedulares (Instituto Nacional de Cancer, 2018). El diagnóstico y el pronóstico de la LLA se realiza a partir de marcadores moleculares identificados en muestras de médula ósea (Anfossi, *et al.*, 2018), este examen suele ser extremadamente doloroso e invasivo; es por esto que es importante investigar nuevos marcadores moleculares que nos permitan dar un diagnóstico y un pronóstico de la enfermedad y que puedan ser estudiados causando el menor daño posible al paciente.

Investigaciones recientes han demostrado que algunos miRNAs y lncRNAs se expresan de manera anormal en la LLA, estas moléculas podrían tener una relación directa con el origen de esta leucemia y su pronóstico ya que interactúan regulando la presencia de proteínas implicadas en muchas funciones celulares (Schotte, *et al.*, 2011). En la presente revisión se describen aquellos

RNAs no codificantes que han sido reportados en asociación con el diagnóstico y pronóstico de la leucemia linfoblástica aguda a partir de las investigaciones más recientes en el campo.

1.1 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La leucemia linfoblástica aguda es el tipo de cáncer más frecuente en niños, por lo que es importante identificar nuevos marcadores moleculares que nos den información sobre el curso de la enfermedad y el pronóstico que puede tener la misma para así poder ofrecer al paciente un tratamiento personalizado. Recientemente se ha identificado un grupo de moléculas de RNAs que no codifican para proteínas y que están implicados en procesos de regulación epigenética. Investigaciones recientes han demostrado que algunos miRNAs y lncRNAs se expresan de manera anormal en neoplasias hematológicas de origen linfoide, estas moléculas podrían tener una relación directa con el origen de este tipo de leucemia ya que interactúan regulando la síntesis de proteínas clave en la regulación de funciones celulares como la proliferación celular y apoptosis.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Los miRNAs y los lncRNAs son moléculas de RNAs cuya expresión anormal ha sido identificada en diferentes tipos de cáncer. Los ncRNAs pueden ser analizados a partir de fluidos corporales como sangre, saliva y orina por lo que su uso como marcadores puede ofrecer a los pacientes un análisis menos invasivo de lo que resulta la obtención de médula ósea, que tradicionalmente es la muestra utilizada para estudios genéticos e inmunohistoquímicos.

1.3 OBJETIVO GENERAL

Identificar la relación entre la expresión de los RNAs no codificantes en el pronóstico de la leucemia linfoblástica aguda.

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Identificar a los RNAs no codificantes cuya expresión anormal este asociada a la leucemia linfoblástica aguda.
- B. Definir aquellos miRNA que pudieran ser utilizados como marcadores pronóstico en la leucemia linfoblástica aguda.

1.5 HIPÓTESIS

Existen RNAs no codificantes específicos que se expresan de forma anormal y tienen relación directa con la transformación celular de los linfocitos hacia la leucemia linfoblástica aguda.

2 MARCO TEÓRICO

Cáncer es un término genérico que se designa a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, cuya característica definitoria es la multiplicación rápida (proliferación) de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos (metástasis).

En el año 2015, el cáncer fue reportado como la segunda causa de muerte en el mundo ocasionando 8,8 millones de defunciones, lo que equivale a que casi una de cada seis defunciones registradas (Organización Mundial de la Salud, 2018).

2.1 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una transformación maligna donde existe una proliferación de células progenitoras linfoides en la médula ósea, sangre periférica y sitios extramedulares (Terwilliger & Abdul-Hay, 2017). La Organización Mundial de la Salud clasificó a la LLA en linfoblástica T (LLA-T), linfoblástica B (LLA-B) y linfoblástica B con anomalías genéticas recurrentes (Tabla I). En los adultos la LLA-B representa aproximadamente el 75% de los casos, mientras que la LLA-T comprende el resto de los casos (Arber, *et al.*, 2016). El 80% de los casos ocurre en niños, pero cuando se presenta en adultos ocurre como una enfermedad devastadora. La incidencia en Estados Unidos es de 1.7 por 100 000 individuos al año. La incidencia de la LLA sigue una distribución bimodal con el primer pico en la infancia y el segundo pico alrededor de los 50 años. El pronóstico en los ancianos es pobre aún con estrategias de intensificación de la dosis de la quimioterapia, sólo el 30-40% de los pacientes adultos logran una remisión a largo plazo (Instituto Nacional de Cancer, 2018).

Tabla I. Clasificación de la Leucemia Linfoblástica Aguda de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud.

Leucemia Linfoblástica Aguda de las células B/Linfoma
LLA-B/Linfoma no especificado de otro modo
LLA-B/Linfoma con anomalías genéticas recurrentes
LLA-B/Linfoma con t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
LLA-B/Linfoma con t(v;11q23.3);KMT2A reorganizado
LLA-B/Linfoma con t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1
LLA-B/Linfoma con hiperdiploidía
LLA-B/Linfoma con hipodiploidía
LLA-B/Linfoma con t(5;14)(q31.1;q32.3) IL3-IGH
LLA-B/Linfoma con t(1;19)(q23;p13.3);TCF3-PBX1
LLA-B/Linfoma con translocaciones BCR-ABL1 (Philadelphia-like)
LLA-B/Linfoma con amplificación intracromosomal de cromosoma 21 (iAMP21)
Leucemia Linfoblástica Aguda de las células T/Linfoma
Entidad provisional Leucemia linfoblástica precursora de linfocitos T tempranos
Entidad provisional Leucemia / linfoma linfoblástica de células natural killer (NK)

Tomado de Arber, *et al.*, 2016.

2.2 MARCADORES MOLECULARES EN LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Las aberraciones cromosómicas son el sello distintivo de la LLA pero no son suficientes para explicar el origen de la leucemia. Las translocaciones características incluyen t(12;21) [*ETV6-RUNX1*], t(1;19) [*TCF3-PBX1*], t(9;22) [*BCR-ABL1*] y reordenamiento del gen de la histona-lisina *N*-metiltransferasa HRX (*MLL*) (Mullighan, *et al.*, 2009). Se han identificado mutaciones en genes que codifican reguladores del desarrollo y diferenciación de células B en el 40% de los casos de la LLA-B progenitora; siendo identificados como blancos de las deleciones los genes EBF1 (Early B Cell Factor 1) y PAX5 (Paired Box 5). La pérdida de un alelo de tipo silvestre PAX5 de las mutaciones identificadas eliminaría la capacidad de activar la transcripción bialélica normal, lo que puede contribuir directamente a la detención de diferenciación observada en la LLA (Mullighan, *et al.*, 2007).

El cromosoma Filadelfia (Ph), fue descrito por primera vez por Nowell y Hungerford como una translocación t(9; 22) [*BCR-ABL1*] (Nowell & Hungerford, 1960). Se ha observado una supresión casi obligatoria del gen que codifica para el factor de transcripción IKZF1 (IKAROS Family Zinc Finger 1) en la LLA BCR-ABL1 positiva, con un 83.7% de casos pediátricos y adultos que contienen deleciones que conducen a una reducción de la dosis y/o la expresión de una isoforma de IKAROS alterada. Estos datos, junto con la baja frecuencia de deleciones de IKZF1 en otros casos pediátricos de la LLA-B progenitora y la falta de aberraciones IKZF1 focales en el análisis

genómico recientemente reportado de tumores no hematopoyéticos, sugieren que las alteraciones en IKAROS contribuyen directamente a la patogénesis de LLA BCR-ABL1 positiva (Mullighan, *et al.*, 2008).

Más recientemente, se ha identificado una variante con perfil de expresión genética similar a la LLA positiva para Ph (Filadelfia) pero sin el reordenamiento de *BCR-ABL1*. La LLA de tipo Ph-like representa aproximadamente el 10% de la LLA-B infantil y el 15% de la LLA-B de alto riesgo y es de tres a cuatro veces más común que la LLA Ph positiva. Las transposiciones y las mutaciones de secuencia que activan la señalización del receptor de citocina y tirosina quinasa son un sello distintivo de la LLA de tipo Ph-like. Además, cada uno de los casos estudiados albergaba lesiones genómicas que afectaban a los factores de transcripción linfoide (más comúnmente deleciones y / o mutaciones de IKZF1), sugiriendo que la perturbación de estas dos vías coopera para inducir la LLA-B e impulsar el perfil de expresión génica Ph-like (Roberts, *et al.*, 2012). En más del 80% de los casos de esta llamada LLA de tipo Ph-like la variante posee deleciones en factores clave de transcripción implicados en el desarrollo de células B, incluido el IKZF1, factor de transcripción 3 (E2A), factor celular temprano 1 (EBF1) y emparejado box 5 (PAX5) (Mullighan, *et al.*, 2007). De forma similar se observan mutaciones activadoras de quinasas en el 90% de la LLA de tipo Ph-like. Los más comunes incluyen reordenamientos que involucran el proto- oncogén ABL1 (ABL1), Janus quinasa 2 (JAK2), Platelet-Derived Growth Factor Receptor Beta (PDGFRB), Citokine Receptor Like Factor 2 (CRLF2) y Receptor de Eritropoyetina (EPOR), activación de mutaciones del Receptor de la Interleucina 7 (IL7R) y Fms Related Tyrosine Kinase 3 (FLT3) y eliminación de la Proteína 3 Adaptadora SH2B (SH2B3), que codifica el regulador LNK13 negativo para JAK2. Esto tiene importantes implicaciones terapéuticas ya que sugiere que la LLA de tipo Ph-like, tiende a tener un peor pronóstico y puede responder a los inhibidores de quinasas (Roberts, *et al.*, 2014). Las leucemias humanas con translocaciones del gen MLL cuentan más del 50% de la leucemia linfoblástica aguda en niños menores de 6 años (Liu, *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha descrito recientemente la base genética la LLA hipodiploide con resultados pobres. En la LLA casi haploide (24-31 cromosomas), se observaron alteraciones en la señalización de tirosina quinasa (RAS) en el 71% de los casos y IKZF3 en 13% de los casos. Por el contrario, la LLA con hipodiploidía (32-39 cromosomas), las alteraciones en los genes de la proteína 53 (P53) (91%), IKZF2 (53%) y retinoblastoma 1 (RB1) (41%) fueron más frecuentes. Tanto el casi haploide como el hipodiploide bajo exhibieron activación en las rutas de señalización de RAS y fosfoinositol 3-quinasa (PI3K),

lo que sugiere que estas vías puede ser un objetivo para el tratamiento de la LLA hipodiploide agresiva (Holmfeldt, *et al.*, 2013).

La edad ha sido reconocida como el factor pronóstico más importante en la LLA. Además de las grandes diferencias en el pronóstico entre la LLA infantil y la de adultos, la edad también afecta de manera crucial el pronóstico entre los adultos, dado que se ha observado que entre los pacientes mayores de 60 años se tiene un pronóstico particularmente precario (Rowe, *et al.*, 2005); este factor es al menos en parte, un sustituto de otros pronosticadores ya que los ancianos tienden a tener enfermedades con una biología molecular intrínseca desfavorable (por ejemplo cromosoma Filadelfia positivo, hipodiploidía y cariotipo complejo), más comorbilidades médicas y la incapacidad de tolerar regímenes de quimioterapia estándar, aunque esta información ayuda a guiar la terapia (Rowe, 2010).

En el ensayo prospectivo más grande para determinar el tratamiento óptimo, MRC UKALL XII / ECOG E2993 se encontró una diferencia significativa de supervivencia sin enfermedad (DSE) y supervivencia general según la edad (SG), utilizando un punto de corte de 35 en la enfermedad Ph-negativa. De manera similar, encontraron un recuento elevado de glóbulos blancos en el momento del diagnóstico, $< 30 \times 10^9/L$ para B-LLA o $< 100 \times 10^9/L$ para T-LLA, este fue un factor de pronóstico independiente para DSE y SG. Sobre la base de estos resultados, las enfermedades negativas podrían clasificarse como de bajo riesgo (sin factores de riesgo según la edad o cuenta de leucocitos), riesgo intermedio (edad < 35 o elevado recuento de leucocitos) o alto riesgo (edad < 35 y elevado recuento de leucocitos). Las tasas de SG a 5 años basadas en estas categorías de riesgo fueron 55, 34 y 5%, respectivamente (Rowe, *et al.*, 2005).

Históricamente, el inmunofenotipo se ha considerado como uno de los factores pronósticos más importantes y ha tenido un gran impacto en la estrategia terapéutica. Hace una década, casi todos los estudios informaron que esto tenía importancia independiente, con la LLA-T que tenía una tasa de respuesta inicial más alta así como una supervivencia superior a largo plazo (Rowe, 2010). De manera similar, la LLA pro B o pre-pre-B y el precursor de células T inmaduras generalmente se asocian con un peor pronóstico (Gökbuget & Hoelzer, 2009).

El cromosoma Filadelfia, que comprende el t (9; 22) (q34; q11), sigue siendo la anormalidad más frecuente y clínicamente significativa en la LLA adulta, con una incidencia que varía del 15 al 50% en pacientes mayores con LLA-B (Faderl, *et al.*, 2003). En el ensayo MRC UKALL XII / ECOG E2993, de los 1522 pacientes registrados en el estudio, se intentó el análisis citogenético previo al

tratamiento en el 90% de los casos. El análisis citogenético cuidadoso se consideró exitoso, después de la revisión central, en casi tres cuartas partes de estos pacientes y entre los que tuvieron un análisis citogenético exitoso se detectó un clon anormal en el 79% de los pacientes. Como era de esperar, la anomalía más frecuente fue el cromosoma Filadelfia, t (9; 22) (q34; q11) / BCR-ABL1, que se detectó en el 19% de los pacientes que utilizaron citogenética convencional, hibridación fluorescente *in situ* (FISH), la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), o una combinación de estos métodos. Aparte del cromosoma Filadelfia, existen las anomalías citogenéticas que comprenden las translocaciones t (4; 11) (q21; p13Æ3), t (8; 14) (q24Æ1; q32) o cariotipo complejo (definidas como cinco o más anomalías cromosómicas), excluyendo pacientes con una translocación establecida, así como aquellos con baja hipodiploidía / casi aploidía que tuvieron un resultado inferior. Por el contrario, los pacientes con alta hiperdiploidía tuvieron un resultado significativamente mejorado (Moorman, *et al.*, 2007).

Además de las características de la enfermedad, se ha reconocido durante mucho tiempo que la respuesta a la terapia inicial predice un resultado. Se ha convertido en una práctica estándar evaluar a los pacientes con el diagnóstico de enfermedad residual mínima (ERM) usando técnicas moleculares como la citometría de flujo y la PCR. En consecuencia, los diagnósticos estandarizados de ERM deben estar disponibles para la evaluación de la respuesta al tratamiento en cada paciente con LLA individual, para ser utilizados en medicina personalizada, como la asignación precisa del grupo de riesgo con el tratamiento adaptado al riesgo (van Dongen, *et al.*, 2015).

2.3 RNAs NO CODIFICANTES COMO MARCADORES MOLECULARES EN LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

En 1993, Victor Ambros y sus colegas, Rosalind Lee y Rhonda Feinbaum descubrieron que el gen *lin-4* en *Caenorhabditis elegans*, implicado en el correcto desarrollo de la larva, no codificaba para una proteína, sino que codifica para moléculas de RNA de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud (*lin-4S* y *lin-4L*) que inhibían la traducción de la proteína Lin-14 reprimiendo al mRNA a través del apareamiento de bases complementarias (Lee, *et al.*, 1993). En el año 2000 se descubrió otro RNA pequeño denominado *let-7*, que inhibía la traducción de *lin-41* en el desarrollo de *C. elegans*; estos RNAs pequeños fueron llamados micro RNAs (miRNA) (Reinhart, *et al.*, 2000).

Homólogos del gen let-7 pronto fueron identificados en los genomas del humano, la mosca y otros once animales bilaterales (Pasquinelli, *et al.*, 2000). Los miRNAs son RNA endógenos de 22 nucleótidos que pueden desempeñar funciones reguladoras importantes en animales y plantas al dirigirse a los RNA mensajeros (mRNA) para la escisión o la represión de la traducción uniéndose por complementariedad de bases más frecuentemente en la región 3' sin traducir (UTR) (Kim, *et al.*, 2009). Los miRNAs comprenden una de las clases más abundantes de moléculas reguladoras de genes en organismos multicelulares y también influyen en la producción de muchos genes que codifican proteínas (Bartel, 2004).

En la misma década de los 90s se descubrieron otros ncRNAs, los RNAs largos no codificantes (lncRNAs), que estaban involucrados en la regulación epigenética, tales como H19 y Xist que constan de al menos 200 nucleótidos de longitud (Kung, *et al.*, 2013).

Otro grupo de RNAs pequeños fueron descubiertos en el año 2001 durante un estudio de perfiles de RNAs pequeños de *Drosophila melanogaster*. Estos estudios descubrieron un subconjunto de RNAs pequeños endógenos específicos de células germinales, con una longitud de 24 a 29 nucleótidos (Aravin, *et al.*, 2001). La mayoría de estos RNAs pequeños corresponden a repetitivos elementos intergénicos, incluyendo los retrotransposones, por lo tanto fueron llamados repeat-associated small interfering RNAs (rasiRNA) (Aravin, *et al.*, 2003). Más recientemente, fueron caracterizados complejos moleculares entre proteínas PIWI y RNAs pequeños, denominándose a estos como RNAs que interaccionan con PIWI (piRNA) (Lau, *et al.*, 2006). Curiosamente, la biogénesis de piRNAs no depende de Dicer (tabla II). Los piRNA están implicados en el silenciamiento del transposón a través de la formación de heterocromatina o la desestabilización del RNA (Kim, *et al.*, 2009).

Los ncRNAs pueden secretarse al espacio extracelular, ya que los RNA libres de células se encapsulan en macrovesículas o se pueden asociar con proteínas o lipoproteínas de alta densidad (HDL), y posteriormente se pueden detectar en muestras de sangre como ncRNA circulante, así como en orina, saliva y otros fluidos corporales (Anfossi, *et al.*, 2018).

La formación de cáncer es la interacción combinada de factores que inhiben el desarrollo de tumores (supresores de tumores) y otros que promueven la proliferación (inductores del cáncer) (Zhang, *et al.*, 2007). Uno de los más grandes desafíos para comprender la función de los ncRNAs en el cáncer es que los ncRNAs no siempre tienen un único rol en el proceso de formación de tumores. Un ncRNA puede funcionar tanto como supresor tumoral en un tipo de cáncer, pero puede

promover la progresión de la enfermedad en otro tipo de cáncer. En otros casos, múltiples especies de genes que se producen del mismo *locus* del gen del ncRNA pueden operar sinérgica o antagónicamente en determinada vía. Las funciones multifacéticas de muchos genes de ncRNA fortalecen la evidencia de que el genoma no está organizado para contener genes individuales con funciones individuales, en vez de eso, un *loci* particular a menudo es altamente multiplicado para producir una gran variedad de productos de genes que permiten un despliegue de posibles respuestas de regulación para las diversas vías (Anastasiadou, *et al.*, 2017). Actualmente, casi todos los estudios relacionados con miRNA sobre cáncer se basan en el perfil de expresión diferencial de miRNAs en células cancerosas frente a células normales. La sobreexpresión y / o represión de miRNAs específicos es un buen método para estudiar la función de los miRNA en la patogénesis del cáncer y su papel específico en el inicio y desarrollo del cáncer (Zhang, *et al.*, 2007).

Los análisis de secuenciación han mostrado que los piRNA son tan abundantes en circulación extracelular como los miRNAs en pacientes sanos y con cáncer (Yuan, *et al.*, 2016), lo que defiende la hipótesis de que los piRNAs pueden estar tan implicados en la generación de leucemia como los miRNAs, por lo cual es importante seguir investigándolos.

Tabla II. Comparación de las características de los miRNAs, piRNAs y lncRNAs.

ncRNA	Característica			
	Longitud	Transcripción	Procesamiento	Función
miRNA	Aproximadamente 22 nucleótidos	Transcritos endógenos en forma de horquilla	Drosha y Dicer	Regulación genética post-transcripcional por complementariedad de bases con un mRNA blanco.
piRNA	De 24 a 29 nucleótidos	Elementos intergenéticos repetitivos, transposones activos o grupos de piRNAs	Independiente de Dicer	Silenciamiento de transposones (formación de heterocromatina o desestabilización de ARN)
lncRNA	Mínimo 200 nucleótidos	Transcritos endógenos	Procesamiento igual al de los mRNA	Regulación del ciclo celular, la estabilidad del RNA y la estructura de la cromatina.

Tomado de: (Kim, Han, & Siomi, 2009) (Trimarchi, *et al.*, 2014)

2.4 BIOGÉNESIS DE LOS MICRORNAs

Los miRNA son parte de una larga transcripción, denominada pri-miRNA, que son transcritos por la RNA polimerasa II (Pol II) (Cai, *et al.*, 2004). Las transcripciones primarias (pri-miRNAs) generadas por Pol II son usualmente de varias kilobases de longitud y contienen estructuras de tallo-asa (Lee, *et al.*, 2002), una vez que el pri-miRNA se transcribe, se procesa en el núcleo por una enzima RNasa III, denominada Drosha, en fragmentos de RNA más pequeños llamados precursores de miRNA (pre-miRNA) (Figura 1) (Lee, *et al.*, 2003), Drosha requiere un cofactor, la proteína del gen 8 de la región crítica del síndrome DiGeorge (DGCR8) en humanos (Han, *et al.*, 2004). Un pri-miRNA típico consiste en un tallo de ~ 33 pares de bases (pb), una asa terminal y segmentos de RNA de cadena lateral adyacentes. DGCR8 interactúa con pri-miRNAs a través de los segmentos de RNA monocatenario (ssRNA) y el tallo de ~ 33 pb, y ayuda a Drosha a escindir el sustrato ~ 11 pb lejos de la unión ssRNA-dsRNA (Han, *et al.*, 2006). La exportación de pre-miRNAs al citoplasma, está mediada por la exportina 5 (EXP5), que es un miembro de la familia de receptores de transporte nuclear (Lund, *et al.*, 2004). Al igual que con otros receptores de transporte nuclear, EXP5 se une cooperativamente a su carga y la forma del cofactor enlazada a guanosín trifosfato (GTP) que se encuentra en el núcleo y libera la carga después de la hidrólisis de GTP en el citoplasma. EXP5 reconoce el tallo de RNA de doble cadena (dsRNA) de >14 pb junto con un saliente corto de 3' (1-8 nt) (Lund, *et al.*, 2004). Seguido de la exportación del núcleo el pre-miRNA es cortado cerca del bucle terminal por una RNasa III denominada Dicer, que reconoce los dsRNAs de secuencias de ~22 pares de nucleótidos liberando un RNA bicatenario (Bernstein, *et al.*, 2001). En humanos, Dicer interactúa con dos proteínas que pueden ser TAR RNA-binding protein (TRBP) y la proteína activadora de la proteína quinasa inducida por interferón (PACT); aunque ninguna de éstas son necesarias para la actividad de Dicer, parecen estar relacionadas con la unión del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) (Chendrimada, *et al.*, 2005) (Lee, *et al.*, 2006). Después del corte por Dicer, resulta un RNA bicatenario al cual se unen una proteína Argonauta, Dicer, TRBP y PACT formando el complejo RISC. El RNA bicatenario es separado para generar dos cadenas de RNA, una de las cuales resulta en el miRNA maduro (cadena guía) y la otra cadena (cadena pasajera) es degradada. Estudios en small interfering RNAs (siRNA) indican que la estabilidad termodinámica relativa de los dos extremos del dsRNA determina cual cadena será seleccionada (Kim, *et al.*, 2009).

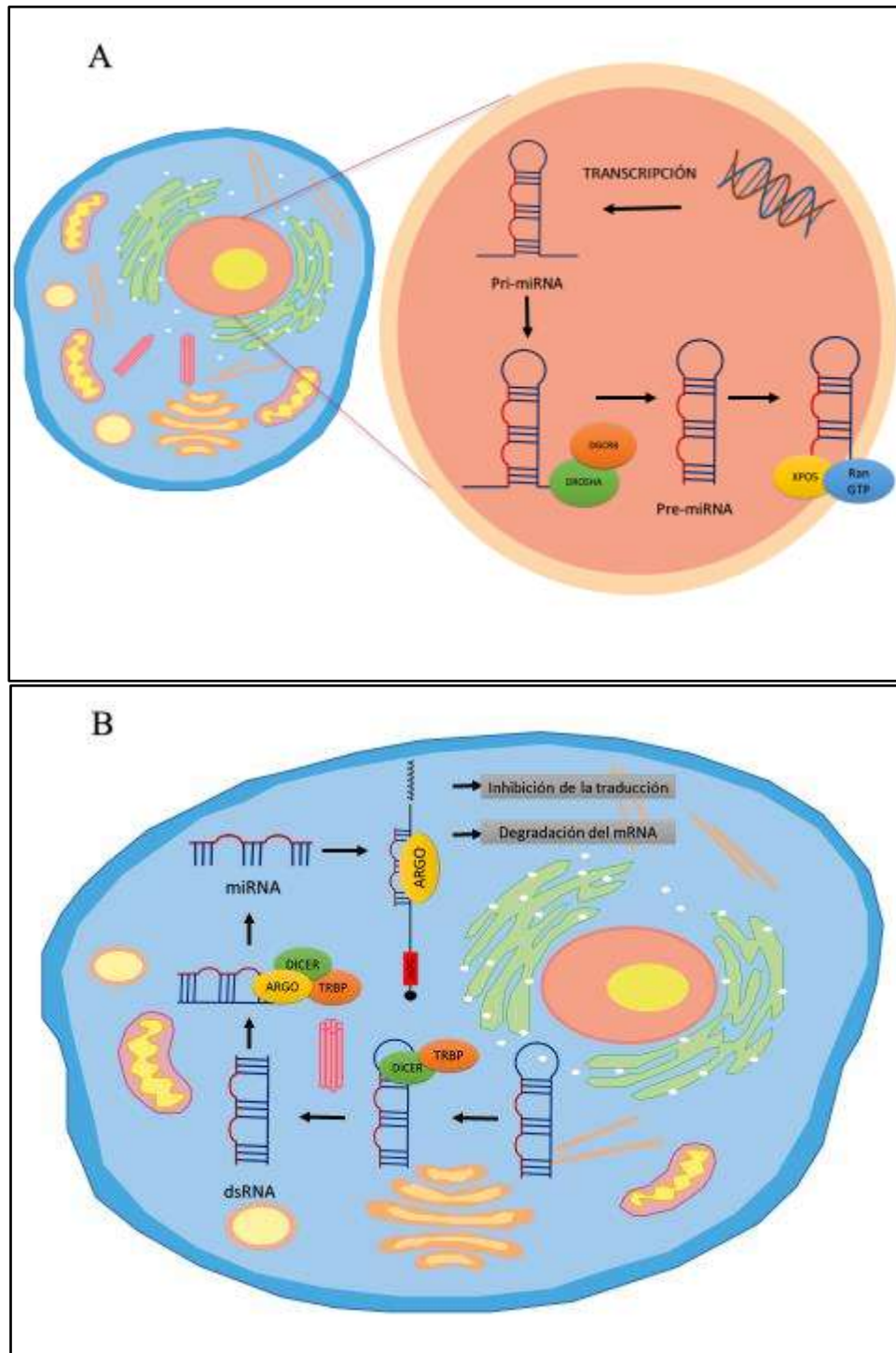


Figura 1 Biogénesis de los miRNAs. En el núcleo ocurre la transcripción del miRNA (pri-miRNA) formado por varias kilobases de longitud, es procesado por DROSHA y DGCR8 que cortan en ~11 pares de bases después la doble cadena (pre-miRNA). La Exportina 5 en conjunto con Ran GTP se encargan de sacar al pre-miRNA del núcleo para continuar con el proceso en el citoplasma (A). En el citoplasma el pre-miRNA es cortado en el asa por DICER y TRBP (dsRNA), es llevado al complejo microprocesador formado por Argonata 2 que corta al dsRNA por la mitad para obtener el miRNA maduro que se une al mRNA por complementariedad de bases, ocasionando la inhibición de la traducción o la degradación del mRNA (B). Modificado de Kim, *et al.*, 2009

2.4.1 Nomenclatura de los microRNAs

Las consideraciones principales para la nomenclatura de los miRNAs son:

1. El nombre de los miRNAs contiene de tres a cuatro letras como prefijo correspondientes a la especie del organismo; ejemplo: hsa-mir-212.
2. Los números como sufijo se refieren al orden de descubrimiento.
3. Se puede predecir que la secuencia de un miRNA maduro se expresa en más de un *locus* precursor de horquilla, denotado con más sufijos numéricos; ejemplos: dme-mir-6-1 y dme-mir-6-2.
4. Los *loci* de horquilla relacionados que expresan secuencias maduras de miRNAs tienen sufijos de letras; ejemplos: mmu-mir-181a y mmu-mir-181b (Griffiths, *et al.*, 2008).

2.5 BIOGÉNESIS DE LOS RNAs PIWI

La biogénesis de los RNAs (PIWI) o piRNAs se divide en dos etapas. Primero, grandes precursores de RNA son transcritos en el núcleo y exportados al citoplasma. En el citoplasma, los precursores de piRNAs son procesados hasta obtener piRNAs maduros que se unen a las proteínas P-element Induced Wimpy testis en *Drosophila* (PIWI). (Huang, *et al.*, 2017). La mayoría de los piRNAs se derivan de secuencias de elementos transponibles que se presentan en muchas copias a través del genoma. Parece ser que una gran fracción de piRNAs se origina de varios *loci*, tales regiones genómicas son llamadas “piRNA clusters”. (Huang, *et al.*, 2017). Los precursores de los piRNAs son RNAs largos de cadena sencilla de más de 100 kb de longitud que son transcritos por la RNA polimerasa II y se procesan en muchos piRNAs diferentes (Brennecke, *et al.*, 2007) Durante la espermatogénesis, al inicio de la etapa del paquiteno comienza la transcripción de los genes de los piRNAs siendo regulados por proteínas del dominio myeloblastosis (Myb) de unión a DNA (Li, *et al.*, 2013). El mecanismo de la vía primaria de la biogénesis de los piRNA todavía se desconoce, mientras que la vía secundaria (amplificación de ping pong) está mediada por las proteínas PIWI (Luteijn & Ketting, 2013). A nivel del silenciamiento del blanco por los piRNAs quedan muchos misterios, por ejemplo, algunas proteínas PIWI actúan en el citoplasma y pueden desencadenar la degradación de los mRNAs. Sin embargo, algunas proteínas piwi también se trasladan al núcleo en la carga de los piRNA, lo que sugiere que pueden tener un papel en el silenciamiento de sus

objetivos a nivel transcripcional (Luteijn & Ketting, 2013). La proteína heterocromatina 1(HP1) se une a los piRNA clusters para que éstos sean diferenciados de otros dominios de cromatina (Klattenhoff, *et al.*, 2009). HP1 no solo funciona al unirse a la histona H3 trimetilada en la lisina 9 (H3K9me3) sino que también actúa como una proteína de unión al RNA que acepta transcritos de sus *loci* unidos y los transporta a sitios en los que se degradarán, esta función podría hacer que HP1 en lugar de dirigirse a los transcritos para su degradación, podría escoltar a los transcritos precursores de piRNAs a los sitios celulares de procesamiento del piRNA (Luteijn & Ketting, 2013). El siguiente paso en la biogénesis de los piRNAs es la especificación del extremo 5'. En la ruta secundaria del piRNA, el extremo 5' de los piRNAs se genera por un corte inducido por proteínas piwi como parte del mecanismo de ping pong, esta acción es realizada por una proteína con actividad de nucleasa llamada Zucchini (Zuc) (Luteijn & Ketting, 2013). Después del corte del extremo 5' y precediendo a la generación del extremo 3' maduro, el piRNAs se une a PIWI, en donde una co-chaperona Hsp70-Hsp90 Organizing protein (HOP) media la interacción entre PIWI y la chaperona heat shock protein 90 (HSP90), lo que facilita la unión del piRNA y las proteínas PIWI (Gangaraju, *et al.*, 2011) (Luteijn & Ketting, 2013). El último paso en la biogénesis de los piRNA consiste en la formación de su extremo 3', la enzima responsable de esta actividad aún no se ha identificado, pero se ha denominado Trimmer (Luteijn & Ketting, 2013). Después la proteína Hen1 realiza una metilación en la posición OH 2' del extremo 3' del piRNA para evitar la uridilación que puede desestabilizar al piRNA (Kurth & Mochizuki, 2009) (Kamminga, *et al.*, 2010). Dentro de las proteínas PIWI resalta la actividad de MILI, MIWI y MIWI2 que han sido asociadas al procesamiento de los piRNAs y juntas inducen a la metilación del DNA en los *loci* blanco del piRNA (Aravin, *et al.*, 2006).

2.6 MICRORNAs COMO MARCADORES MOLECULARES EN LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE LAS CÉLULAS B

2.6.1 MicroRNAs en leucemias BCR-ABL positivo

En la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas en la LLA BCR-ABL positiva, se identificaron blancos de miRNAs con expresión diferencial y función en estas células, encontrándose para el grupo miR-17~92, conformado por miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 y miR-92-1

(Figura 2) (Scherr, *et al.*, 2014), que su expresión está implicada en el desarrollo de las células B, induciendo la transición de linfocitos pro-B a linfocitos pre-B, donde actúa como antagonista de la expresión de Bcl-2-like protein 11 (Bim), un gen pro-apoptótico (Ventura, *et al.*, 2008). De manera notable y previamente, la inducción de B-cell CLL/Lymphoma 2 (Bcl2) ha demostrado ser importante para la prevención de la apoptosis en células Ba/F3 que expresan BCR-ABL (Isanchez-García & Grutz, 1995). La disminución de la expresión de miR-17-92 puede ser un mediador importante de este efecto. Esto también puede explicar por qué la sobreexpresión del grupo tiene poco efecto fenotípico en las células BCR-ABL negativas, donde la expresión de Bcl2 puede ser menos crítica (Scherr, *et al.*, 2014).

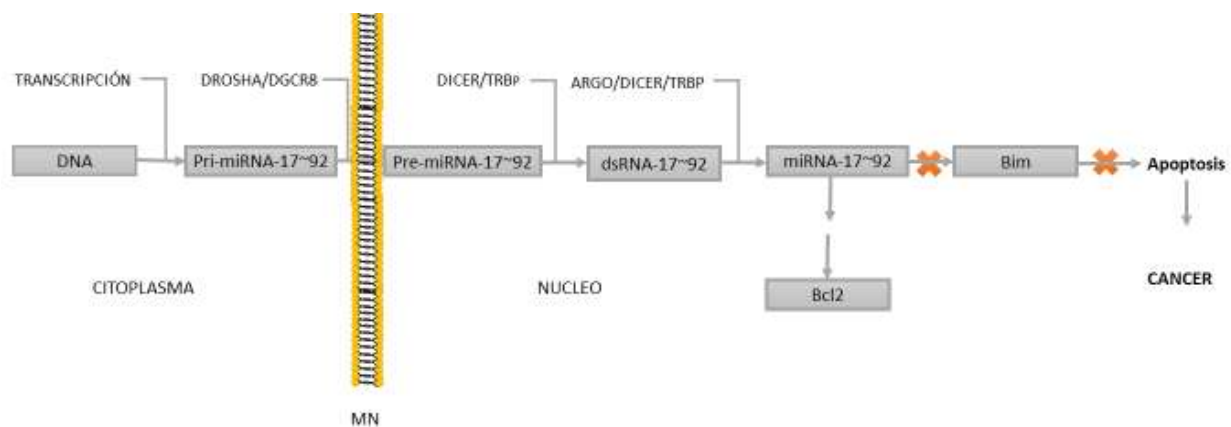


Figura 2. Vía de regulación del grupo miR-17~92. El grupo de miRNA-17~92 se expresa en la LLA BCR-ABL positiva actuando como oncogén, ya que va dirigido a BIM una proteína proapoptótica, lo que impide la apoptosis de la célula que posteriormente da lugar a la generación de leucemia. MN: membrana nuclear.

Por otro lado, la baja expresión de miR-100 y miR-99a se encontró relacionada en pacientes con un alto riesgo en factores pronósticos en la LLA-B con reordenamiento del gen MLL y BCR-ABL positiva. La sobre expresión de estos dos miRNAs inhibe la proliferación celular, por lo tanto, juntos actúan como un supresor tumoral. El factor de transcripción FKBP51 fue identificado como blanco de ambos miRNAs, tiene un papel importante en la proliferación celular en enfermedades neoplásicas; sin embargo, su papel en leucemias linfoblásticas no ha sido determinado aún. Además existen otros dos genes blancos importantes, insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) y mammalian target of Rapamycin (mTOR) que desencadenan una cascada de señalización compleja que estimula la diferenciación, la proliferación y la supervivencia celular (Li, *et al.*, 2013).

2.6.2 MicroRNAs en leucemias con reordenamiento de MLL

Se encontró que 19 blancos putativos de mir-17-92 parecían estar regulados negativamente en las leucemias de reordenamiento MLL; mediante un ensayo de análisis serial de expresión genética (SAGE) se detectó la baja expresión de la proteína precursora amiloidea (APP), la proteína miembro 2 de la familia de dominio de asociación a Ras (RASSF2) y la proteína 5 de unión al dominio SH3 (SH3BP5), y la sobre expresión del grupo mir-17-92. Tanto APP como RASSF2 son dianas directas de miR-17. RASSF2 codifica una proteína que contiene un dominio de asociación Ras y es un supresor tumoral, que se ha observado que regula la señalización de Ras (Li, *et al.*, 2009). La sobre expresión del grupo miR-17~92 se ha visto asociada a la amplificación genómica del *locus*, pero no por la metilación del DNA, lo que sugiere que la sobre expresión del grupo miR-17~92 podría estar implicada en el desarrollo de leucemias con reordenamiento de MLL (Mi, *et al.*, 2010).

En un estudio de muestras de médula ósea de pacientes con LLA infantil con t(4;11) se seleccionaron siete microRNAs que al estar expuestos al inhibidor de DNA metiltransferasa, Zebularine, dió como resultado su demetilación y reexpresión de miR-200b, miR-200a, miR-429, miR-152, miR-10a, miR-503 y miR-432 (Stumpel, *et al.*, 2011). Algunos de estos miRNAs se han descrito como supresores tumorales, la disminución de la expresión de miR-200b en cánceres humanos conduce a la progresión de la enfermedad a través de la expresión elevada de los dos receptores transcripcionales de E-cadherina: Zinc finger E-box Binding Homeobox 1 y 2 (ZEB1 y ZEB2) (Gregory, *et al.*, 2008). En este estudio se encontró que el grupo miR-424-503 está regulado negativamente por la hipermetilación de las islas CpG en t (4; 11) -LLA positiva, posiblemente dirigida por la fusión MLL-AF4 (Stumpel, *et al.*, 2011). miR-10a también disminuyó su expresión en todas las leucemias que llevan a cabo los principales eventos de translocación, asociados con un pronóstico más favorable, se sabe que miR-10a se dirige al gen Homeobox A1 (HOXA1) (Dixon-McIver, *et al.*, 2008). En concordancia con el silenciamiento de miR-10a, la expresión de Homeobox A3 (HOXA3) es elevada en t (4; 11) -LLA infantil positiva. Sin embargo, la reactivación de miR-10a por demetilación solo reprime marginalmente la expresión de HOXA3 a nivel de mRNA, lo que sugiere que miR-10a ejerce su inhibición en HOXA3 blanco putativo principalmente a nivel de proteína. La inactivación epigenética de miR-152 evita la regulación

negativa de MLL tipo silvestre, siendo este necesario para inducir la leucemia por MLL-AF9 (Gregory, *et al.*, 2008).

En otro estudio miR-143 fue identificado como un regulador de la expresión de MLL-AF4. La pérdida de la expresión de miR-143 puede a su vez ocasionar la sobre expresión de MLL-AF4. La fusión de la proteína MLL-AF9 es un marcador de pobre pronóstico en pacientes con LLA-B debido a que es importante para la proliferación celular, lo que sugiere que miR-143 actúa como un supresor tumoral ya que al inducir el tratamiento de las células con 5-azacitidina, miR-143 se sobre expresa y se disminuye su metilación, induciendo también la apoptosis (Dou, *et al.*, 2012).

Una fuerte asociación con los niveles de expresión de los genes pertenecientes al grupo HOXA con miRNA-196b se ha mostrado en LLA pediátrica debido a que este miRNA es codificado dentro de este grupo de genes; esta información sugiere que existe una coactivación de miR-196b y el grupo HOXA en la LLA mostrando un mal pronóstico (Schotte, *et al.*, 2010). miR-708 también podría estar implicado en la regulación de dos genes que están vinculados a la leucemia: IKZF4, un regulador de la diferenciación celular, que contribuye a la generación de leucemia si tiene una expresión desregulada, y el oncogén Feline sarcoma (Fes) implicado en la supervivencia celular. Juntos, miR196b y miR708 podrían inhibir la traducción de proteínas asociadas con la supervivencia normal y el desarrollo de los linfocitos, contribuyendo así con la generación de leucemia (Schotte, *et al.*, 2009).

2.6.3 MicroRNAs en LLA-B con t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1

Se ha observado un incremento en la expresión de miR-125b junto con miR-99a y Let-7c específicamente asociado con LLA-B con TEL-AML1 (ETV6-RUNX1), la LLA infantil más común. La sobreexpresión de este grupo de miRNAs llamado miR-125b-2 provee una ventaja de supervivencia celular suprimiendo la apoptosis y la activación de la caspasa 3 en respuesta a las condiciones inhibitorias de crecimiento. Además, un estudio reciente sugiere que p53 es negativamente regulada por miR-125b (Gefen, *et al.*, 2010).

2.6.4 MicroRNAs en LLA-B con t(5;14)(q31.1;q32.3) IL3-IGH

Estudios sugieren que los miR-125 están implicados en la diferenciación celular. La inserción de miR-125b-1 en el alelo de la inmunoglobulina de cadena pesada (IGH) podría afectar la expresión del miRNA en células B precursoras, lo que lleva a una diferenciación aberrante. Esta información sugiere que miR-125b-1 está implicado en la generación de leucemia de las células precursoras en la LLA-B y tiene como blanco el gen alterado IGH (Sonoki, *et al.*, 2005).

2.7 MICRORNAs COMO MARCADORES EN LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE LAS CÉLULAS T

2.7.1 MicroRNAs en leucemia precursora de linfocitos T tempranos

En un estudio se realizaron pequeñas secuencias de RNA en 48 muestras de pacientes con LLA-T para finalizar la caracterización transcripcional de LLA-T humana mediante un análisis de expresión de miRNAs. Se identificó una selección de nuevos miRNAs en LLA-T con niveles de expresión muy elevados, incluidos miR-181b-5p, miR-423-3p, miR-486-5p y miR-92b-3p. Existe evidencia que sugiere que miR-181b-5p tiene un importante papel como oncogén, afectando muchos tipos de tumores (Liu, *et al.*, 2014). En el contexto de la leucemia, se ha demostrado que la sobreexpresión de miR-181b-5p mejora la proliferación en la leucemia mieloide aguda al dirigirse a MLK2 (Wallaert, *et al.*, 2017). Además, miR-92b-3p se identificó como un oncomiR en el glioblastoma al dirigirse al miembro de la familia SMAD tipo 3 (SMAD3), que se sabe que se pierde en varios casos de ALL-T pediátrica, y PTEN, un oncosupresor en LLA-T bien establecido (Wallaert, *et al.*, 2017) (Zuurbier, *et al.*, 2012). MiR-486-3p se encuentra altamente expresado en LLA-T, es un conocido oncogén que está dirigido al factor de transcripción MAF y es regulado negativamente sobre el silenciamiento MYB junto con el gen del anfitrión ankyrin-1 (ANK1), miR-486-3p es compatible con la diferenciación eritroide y granulocítica, mientras que interfiere negativamente con la diferenciación de megacariocitos y macrófagos (Bianchi, *et al.*, 2015) (Wallaert, *et al.*, 2017).

Para identificar la actividad oncogénica del grupo miRNA-19~92, se realizó un ensayo de transformación hematopoyética *in vitro*, basado en la dependencia de interleucina-3 (IL-3) de los

linfocitos FL5-12 que experimentan apoptosis cuando se elimina la IL-3. miR-19 mostró protección directa contra la muerte celular en células FL5-12 después de la retirada de IL-3; sin embargo, miRNA-19 mostró poco efecto en la proliferación celular (Mavrakis, *et al.*, 2010). Mir-19 interactúa con Notch1 por dos translocaciones, una que activa el gen homólogo de notch 1, asociado a la translocación (*Drosophila*) (NOTCH1) (t(9;14) (q34;q11)) y otra que se dirige al grupo miR-17~92 (t(13;14) (q34;q11)). Lo que indica que la activación transcripcional de los genes Myc (mielocitomatosis) y Notch1 pudiera ser causa de la sobre expresión de miR-19. Por medio de un enfoque de cribado de short hairpin (shRNA) imparcial, se identificó un patrón de regulación de genes por miRNA-19, se encontraron cinco genes que albergan sitios de unión a miR-19; Estos incluyen Bim que codifica a una proteína Bcl2 proapoptótica (Ventura, *et al.*, 2008) y también a la subunidad catalítica activada por AMP de la proteína quinasa alfa 1 (Prkaa1), la proteína fosfatasa 2 (Pp2a) y el homólogo de fosfatasa y tensina 8 (Pten8). Estos resultados sugieren que miR-19 coordina un programa de la proteína fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) relacionado con la vía de la supervivencia celular en linfocitos que contribuye a la generación de leucemia (Mavrakis, *et al.*, 2010). Además, estudios más recientes han demostrado que miR-19 también inhibe el gen de la cilindromatosis (CYLD), la cual se encontró con una baja expresión en células con LLA-T comparado con lo expresado en personas sanas. La baja expresión de miR-19 parece restaurar significativamente la expresión de CYLD. La alta expresión de CYLD reduce significativamente la translocación del factor nuclear de las cadenas ligeras *kappa* de las células B activadas (NFκB) y la expresión de interleucina 6 (IL-6), sugiriendo que miR-19 y CYLD podrían tener un rol importante en la regulación de la vía NFκB (Ye, *et al.*, 2012).

Se ha encontrado que miR-142-3p tiene un papel oncogénico en la generación de leucemia promoviendo el crecimiento de las células T leucémicas y aumentando la resistencia al tratamiento con glucocorticoides (Lv, *et al.*, 2012). miR-142-3p regula la expresión de adeníl ciclasa (AC9) a un nivel transcripcional y la producción de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) en las células T. La baja expresión de miR-142-3p incrementa la expresión de cAMP; sin embargo, Forkhead box P3 (FOXP3) regula la expresión de miR-142-3p y la disminución de la expresión de esta proteína aumenta la expresión de miR-142-3p (Huang, *et al.*, 2009). Esta desregularización podría resultar en la proliferación anormal de las células T e incluso en la generación de leucemia. De cualquier modo, los niveles de miR-142-3p se correlacionan directamente con el pronóstico de pacientes con LLA. Además se encontró que miR-142-3p tiene como blanco el receptor de glucocorticoides GCα con función activadora, más que el GCβ con función inhibitoria. Por lo tanto la baja expresión de

GCa y la alta expresión del GCβ pueden contribuir a la resistencia de los glucocorticoides. (Lv, *et al.*, 2012).

La proteína 1 de leucemia linfocítica aguda de las células T (TAL1) es un factor de transcripción esencial para el mantenimiento de las células madre hematopoyéticas y la regulación de la hematopoyesis temprana. La expresión aberrante de TAL1 contribuye a la generación de leucemia en el desarrollo de timocitos debido en parte a una disminución de la expresión de miR-146b-5p que tiene un rol como supresor tumoral en las células T comparado con células sanas (Correia, *et al.*, 2016).

miR-193b-3p es un importante regulador de la expresión de MYB durante el desarrollo normal de las células T. MYB es un oncogén descubierto como un gen transformador viral en células hematopoyéticas, por lo tanto miR-193-3P actúa como un supresor tumoral (Mets, *et al.*, 2014).

2.7.2 MicroRNAs en leucemia linfoblástica de células natural killer (NK)

miR-21 y miR-155 se encontraron sobre expresados en un grupo de muestras de pacientes con linfoma/leucemia de células natural killer (NK) actuando sobre PTEN y el inositol polifosfato-5-fosfatasa D (SHIP1) respectivamente, para regular a la AKT, una serin-treonin quinasa involucrada en varias funciones celulares, incluida la regulación de la supervivencia y la proliferación celular, por lo que estos miRNAs podrían estar involucrados en la generación de leucemia de las células NK (Yamanaka, *et al.*, 2009).

2.8 RNAs LARGOS NO CODIFICANTES COMO BIOMARCADORES EN LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

LUNAR1 (leukemia-induced noncoding activator RNA) es un RNA largo no codificante (lncRNA) que se localiza en el núcleo y muestra patrones dependientes de Notch específicos de la LLA-T y una alta correlación con IGF1R insulin-like growth factor receptor1. Se demostró que el silenciamiento de LUNAR1 conducía a una disminución de la expresión de IGF1R en células con LLA-T y una actividad disminuida de la ruta de IGF1 (Trimarchi, *et al.*, 2014).

2.9 MÉTODOS DE ESTUDIO DE LOS RNAs NO CODIFICANTES

2.9.1 Muestras biológicas

Para poder realizar un estudio correcto de los RNAs no codificantes expresados en la LLA se requieren muestras de sangre o médula ósea de pacientes previamente diagnosticados en base a evaluación morfológica, inmunofenotipo y citoquímica. Los pacientes deberán dar previamente su consentimiento, se definen los criterios de aceptación o rechazo (por ejemplo, muestras coaguladas, pacientes con tratamiento) (Lv, *et al.*, 2012). Para los análisis de ncRNA basados en sangre, se debe prestar especial atención en la preservación de la sangre debido a la posible degradación y contaminación con ncRNAs de células dañadas durante el procesamiento, por ejemplo, debido a la hemólisis (Anfossi, *et al.*, 2018).

2.9.2 Aislamiento de ncRNA

Actualmente muchos kits comerciales listos para usar están disponibles para el aislamiento de ncRNA como una fracción de RNA total. La mayoría de las técnicas están basadas en un enfoque particular, ya sea basado en sustancias químicas, basadas en columnas o en perlas, permiten el aislamiento de tipos comparables de ncRNAs, aunque la eficiencia de la extracción de RNA puede variar mucho dependiendo de la cantidad de material de entrada utilizado (Anfossi, *et al.*, 2018).

2.9.3 Métodos de cuantificación de los ncRNAs

El principal desafío analítico asociado con el análisis de ncRNAs es la elección de la plataforma de detección. Los ensayos cuantitativos de PCR de transcripción inversa (qRT-PCR), los microarreglos y las tecnologías basadas en la secuenciación de la próxima generación (NGS) se utilizan con mayor frecuencia para la cuantificación de los miRNA y los lncRNA. Mientras que las técnicas basadas en qRT-PCR son rápidas, altamente sensibles, requieren pequeñas cantidades de

material de entrada, son fáciles de personalizar y entregan resultados fácilmente interpretables, el rendimiento es bajo y solo se puede analizar un número limitado de ncRNAs. Los microarreglos superan estas limitaciones, permitiendo la investigación de alto rendimiento de miles de ncRNAs simultáneamente; sin embargo, la mayoría de las matrices requieren sistemas de lectura complementarios o una secuenciación masivamente paralela (Anfossi, *et al.*, 2018).

Para la técnica de RT-PCR se utilizan iniciadores de transcripción inversa para los ncRNAs que son diseñados con el servidor mfold versión 2.3 y se realiza el análisis mediante un PCR de transcripción inversa (RT-PCR), método en el cual se utilizan 100 ng de ncRNA para la síntesis de cDNA. El producto de cDNA se amplifica por PCR con los iniciadores en sentido y antisentido; estos oligonucleótidos se mezclan con la sonda Taqman para la PCR en tiempo real con TaqMan Universal PCR Master Mix. Las mezclas de reacción se incuban a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto en un Stratagene quantitative RT-PCR. Los datos son analizados mediante el método Delta Ct (umbral de ciclo) (Lv, *et al.*, 2012).

3 RESULTADOS

De acuerdo a la información recaudada sobre los microRNAs que se expresan en la LLA se clasificaron de acuerdo a lo establecido en la Organización Mundial de la Salud, al pronóstico, al tipo de regulación y al blanco celular de cada uno (Tabla III); esta nueva clasificación puede dar información importante sobre el avance de la enfermedad y posibles nuevos blancos terapéuticos. Sin embargo, no se encontró información acerca de los piwiRNAs relacionados con la LLA. Existen investigaciones que sugieren que esos piRNAs pueden estar altamente relacionados con la generación de leucemia debido a que se encuentran desregulados en pacientes con cáncer, al igual que los miRNAs. La revisión bibliográfica realizada en esta investigación arrojó como resultado la expresión anormal de 21 miRNAs relacionados con la generación de LLA, así como el pronóstico derivado de la desregulación de éstos. Solo se ha registrado un lncRNA hasta el momento en relación con la LLA denominado LUNAR 1 cuya baja expresión se relaciona con la activación de inductores de leucemia por lo que podría actuar como un supresor tumoral (Trimarchi, *et al.*, 2014).

Los miRNAs que se muestran desregulados en la LLA se expresan anormalmente también en otros tipos de cáncer (tabla IV), aunque en cada uno se expresan de manera diferente. Esto refuerza la teoría de que este grupo de miRNAs está implicado en la generación de la leucemia y que la facilidad con la cual se estudian hacen factible el que puedan ser usados como nuevos marcadores moleculares.

miR-17~92, miR-196b, miR-125b, miR-142-3p, miR-92b-3p, miR-486-3p y miR-19; se encuentran sobre expresados en diferentes tipos de LLA, por lo tanto pueden ser detectados en muestras biológicas.

Tabla III. RNAs no codificantes expresados en la Leucemia Linfoblástica Aguda

Tipo de LLA	RNAnc	Pronóstico	Regulación	Blanco celular
LLA-B/Linfoma con t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1	miR-17~92	Malo	Sobre expresado	Bim
	miR-100/99a	Malo	Baja expresión	FKBP51, IGF1R y mTOR
LLA-B/Linfoma con t(v;11q23.3);KMT2A reorganizado	miR-196b	Malo	Sobre expresado	HOXA
	miR-708	Malo	Desregulado	IKZF4, Fes
	miR-17~92	Malo	Sobre expresado	APP, RASSF2 y SH3BP5
	Let-7	Malo	Baja expresión	NRAS, KRAS, MYC y HMGA2
	miR-148/152	Bueno	Baja expresión	DNMT1
	miR-200b/429	Bueno	Baja expresión	ZEB2 y ZEB1
	miR-10a	Bueno	Baja expresión	HOXA1, HOXA3
	miR-629	Malo	Sobre expresión	N.E.
	miR-143	Bueno	Baja expresión	N. E.
	miR-100/99a	Malo	Baja expresión	FKBP51, IGF1R y mTOR
LLA-B/Linfoma con t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1	miR-125b	Malo	Sobre expresión	P53
	miR-361-3p	Bueno	Sobre expresado	N.E.
LLA-B/Linfoma con t(5;14)(q31.1;q32.3) IL3-IGH	miR-125	Malo	Sobre expresado	IGH
LLA-B/Linfoma con t(1;19)(q23;p13.3);TCF3-PBX1	miR-146b	Bueno	Sobre expresión	N.E.
	miR-126	Bueno	Sobre expresión	N.E.
Entidad provisional Leucemia linfoblástica precursora de linfocitos T tempranos	miR-142-3p	Malo	Sobre expresado	AC9, cAMP Y GCα
Entidad provisional Leucemia linfoblástica precursora de linfocitos T tempranos	miR-92b-3p	Malo	Sobre expresado	SMAD3, MLK2 y PTEN
	miR-708	Malo	Desregulado	N.E.
	miR-151	Malo	Baja expresión	N.E.
	miR-148a	Malo	Sobre expresado	N.E.
	miR-424	Malo	Sobre expresado	N.E.
	miR-486-3p	Malo	Sobre expresado	MAF, MYB
	miR-19	Bueno	Sobre expresado	c-Myc, Notch 1, Bcl2
	miR-100/99a	Bueno	Baja expresión	FKBP51, IGF1R y mTOR
	miR-146b-5p	Bueno	Baja expresión	TAL1
	miR-142-3p	Malo	Sobre expresado	AC9
	LUNAR1	N.E.	Baja expresión	IGF1R

*N.E.: No especificado. Desregulado: Puede aumentar o disminuir la expresión

Tabla IV. Micro RNAs en Leucemia Linfoblástica Aguda y otros tipos de cáncer.

miRNAs en LLA	miRNAs en otros tipos de cáncer	Referencias
miR-17~92	Linfoma, cáncer de pulmón, cáncer de colon, neuroblastomas, cáncer de estómago.	Concepcion, <i>et al.</i> , 2012
miR-196b	Carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello.	Álvarez-Teijeiro, <i>et al.</i> , 2017
miR-708	Sarcoma de Ewing, cáncer de pulmón, leucemia linfoblástica crónica, linfoma, mieloma múltiple, cáncer de vejiga, cáncer de mama, glioblastoma multiforme, carcinoma hepatocelular, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de las células renales.	Monteleone & Lutz, 2017
Let-7	Cáncer de pulmón, linfoma de Burkitt, cáncer de mama, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de tiroides, carcinoma oral de células escamosas, cáncer de ovario, cáncer pancreático, neuroblastoma, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer endometrial, cáncer colorrectal.	Thammaiah & Jayaram, 2016
miR-148/152	Mieloma múltiple, carcinoma hepatocelular, neuroblastoma, cencer de estómago, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer de nasofaringe.	Friedrich, <i>et al.</i> , 2017
miR-200b/429	Cáncer de mama, cáncer pancreático y cáncer hepático.	Peng, <i>et al.</i> , 2013
miR-10	Cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de colon y esófago, glioblastoma, carcinoma hepatocelular, melanoma, neurofibromatosis, cáncer pancreático, carcinoma urotelial y leucemia mieloide aguda.	Bryant, <i>et al.</i> , 2012
miR-629	Cáncer de pulmón, carcinoma de células renales, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer cervical y cáncer colorrectal.	Lu, <i>et al.</i> , 2018
miR-143	Cáncer colorectal, cáncer de próstata, cáncer cervical, cáncer de ovario, linfoma de células B y osteosarcoma.	Sol, <i>et al.</i> , 2018
miR-125b	Cáncer de vejiga, cáncer de mama, carcinoma oral de células escamosas, cáncer de estómago.	Wu, <i>et al.</i> , 2015
miR-361-3p	Cáncer de pulmón, carcinoma hepatocelular, cáncer cervical, cáncer de mama, cáncer de próstata.	Liu, <i>et al.</i> , 2018
miR-146	Cancer de tiroides, cáncer de ovario y cáncer de mama.	Qiu, <i>et al.</i> , 2017
miR-126	Cáncer del tracto intestinal, cáncer de mama, cáncer de tiroides.	Ebrahimi, <i>et al.</i> , 2014
miR-142-3p	Cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario.	Gao, <i>et al.</i> , 2018
miR-151	Cáncer de mama y carcinoma hepatocelular.	Krell, <i>et al.</i> , 2012
miR-424	Cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer renal, carcinoma hepatocelular y cáncer colorrectal.	Fang, <i>et al.</i> , 2018
miR-486-3p	Carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer pancreático.	Jiang, <i>et al.</i> , 2018
miR-99a/100	Carcinoma, cáncer de mama, cáncer de próstata.	Hu, <i>et al.</i> , 2014

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los ncRNA son moléculas de RNA que no codifican para proteínas y tienen funciones de regulación epigenética; estas moléculas se han encontrado sobre expresadas o inhibidas en diferentes tipos de cáncer, lo que indica que su expresión podría estar directamente relacionada con el origen del cáncer (Huang, *et al.*, 2013) (Anastasiadou, *et al.*, 2017). La LLA es el tipo de cáncer más común en niños y su diagnóstico se basa en marcadores moleculares que se identifican a partir de muestras de médula ósea, un estudio que suele ser extremadamente doloroso e invasivo (Jabbour, *et al.*, 2005) (Terwilliger & Abdul-Hay, 2017). Los ncRNAs se pueden extraer de fluidos como sangre periférica, orina y saliva, y se pueden detectar fácilmente a través de metodologías de microarreglos (Lv, *et al.*, 2012) (Anfossi, *et al.*, 2018). Hasta el momento existen reportes que relacionan la expresión anormal de un grupo de 21 miRNAs con el desarrollo de leucemia y se expresan de manera diferente en cada subtipo de LLA, lo que hace posible realizar un pronóstico basado en la identificación de estas moléculas. Este grupo de miRNAs se ha relacionado también con otros tipos de cáncer, lo que nos indica que tienen un papel importante la regulación del ciclo celular y en el origen del cáncer. Por otra parte, se ha reportado que la expresión de un lncRNA denominado LUNAR1 puede tener un rol como activador de inductores de la leucemia por lo que es considerado como un supresor tumoral (Trimarchi, *et al.*, 2014).

Por el momento no se han reportado piRNAs relacionados con la LLA; sin embargo, existen investigaciones que sugieren que los piRNAs pueden estar altamente relacionados con la generación de leucemia debido a que también se encuentran expresados anormalmente en células germinales de pacientes con cáncer (Weng, *et al.*, 2019). Por lo que es importante seguir investigando si existe relación entre su expresión y la generación de leucemia.

Se propone el análisis de miR-17~92, miR-196b, miR-125b, miR-142-3p, miR-92b-3p, miR-486-3p y miR-19 como posibles marcadores pronóstico de la LLA, ya que estos miRNAs han sido reportados como sobre expresados en alguno de los subtipos de LLA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez-Teijeiro, S., Menéndez, S. T., Villaronga, M. A., Rodrigo, J. P., Manterola, R., de Villalaín, L., de Vicente, J. C., Alonso-Durán, L., Fernández, M. P., Lawrie, C. H., and García-Pedrero, J. M. (2017). Dysregulation of Mir-196b in head and neck cancers leads to pleiotropic effects in the tumor cells and surrounding stromal fibroblasts. *nature*, 1-11.
- Anastasiadou, E., Jacob, L. s., and Slack, F. J. (2017). Non-coding RNA networks in cancer. *Nature Cancer Reviews*, 18(1): 5-18.
- Anfossi, S., Babayan, A., Pantel, K., and Calin, G. A. (2018). Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15, 541–563.
- Aravin, A. A., Lagos, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J., and Tuschl, T. (2003). The Small RNA Profile during *Drosophila melanogaster* Development. *Developmental Cell*, 337-350.
- Aravin, A. A., Naumova, N. M., Tulin, A. V., Vagin, V. V., Rosovsky, Y. M., and Gvozdev, V. A. (2001). Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Current Biology*, 11: 1017-1027.
- Aravin, A., Gaidatzis, D., Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., Landgraf, P., Iovino, N., Morris, P., Brownstein, M. J., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., Sheridan, R., Sander, C., Zavolan, M., and Tuschl, T. (2006). A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*, 442: 203-207.
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., Bloomfield, C. C., Cazzola, M., and Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 2391-2405.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, Vol. 116, 281-297.
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Galton, D. A., Gralnick, H. R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the Clasification of the Acute Leukaemias. French-American-British (FAB) Co-operative group. *British Journal of Haematology*, (33): 451-458.

- Bernstein, E., Caudy, A., Hammond, S., and Hannon, G. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 363-366.
- Bianchi, E., Bulgarelli, J., Ruberti, S., Rontautoli, S., Sacchi, G., Norfo, R., and Manfredini, R. (2015). MYB controls erythroid versus megakaryocyte lineage fate decision through the miR-486-3p-mediated downregulation of MAF. *Cell Death and Differentiation*, 1906-1921.
- Brennecke, J., Aravin, A. A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., and Hannon, G. J. (2007). Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*, 128, 1089-1103.
- Bryant, A., Palma, C. A., Jayaswal, V., Yang, Y. W., Lutherborrow, M., and Ma, D. D. (2012). miR-10a is aberrantly overexpressed in Nucleophosmin 1 mutated acute myeloid leukaemia and its suppression induces cell death. *Molecular Cancer*, 11(8).
- Cai, X., Hagedorn, C. H., and Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10: 1957–1966.
- Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 740-744.
- Chessells, J. M., Harrison, G., Richards, S. M., Bailey, C. C., Hill, F. G., Gibson, B., and Hann, I. M. (2001). Down's syndrome and acute lymphoblastic. *Arch Dis Child*, 85:321–325.
- Concepcion, C. P., Bonetti, C., and Ventura, A. (2012). The miR-17-92 family of microRNA clusters in development and disease. *Cancer journal*, 18(3), 262-267.
- Correia, N. C., Fragoso, R., Carvalho, T., Enguita, F. J., and Barata, J. T. (2016). MiR-146b negatively regulates migration and delays progression of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature*, 1-10.
- Deng, W., and Lin, H. (2002). miwi, a Murine homolog of Piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Developmental Cell*, 2, 819-830.

- Dixon-McIver, A., East, P., Mein, C. A., Cazier, J.-B., Molloy, G., Chaplin, T., Andrew Lister, T., Young, B. D., and Debernardi, S. (2008). Distinctive Patterns of MicroRNA Expression Associated with Karyotype in Acute Myeloid Leukaemia. *PLoS One*.
- Dou, L., Zheng, D., Li, J., Li, Y., Gao, L., Wang, L., and Yu, L. (2012). Methylation-mediated repression of microRNA-143 enhances MLL–AF4 oncogene expression. *Oncogene*, 507-517.
- Ebrahimi, F., Gopalean, V., Smith, R. A., and Lam, A. K.-Y. (2014). miR-126 in human cancers: clinical roles and current perspectives. *Experimental and molecular pathology*, 96, 98-107.
- Faderl, S., Jeha, S., and Kantarjian, H. M. (2003). The Biology and Therapy of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer*, 1337-1354.
- Fang, Y., Liang, X., Xu, J., and Cai, X. (2018). miR-424 targets AKT3 and PSAT I and has a tumor-suppressive role in human colorectal cancer. *Cancer Management and Research*, 6537-6547.
- Friedrich, M., Pracht, K., Mashreghi, M.-F., Jack, H.-M., Radbruch, A., and Seliger, B. (2017). The role of the mir-148/152 family in physiology and disease. *European Journal of Immunology*.
- Gangaraju, V. K., Yin, H., Weiner, M. M., Wang, J., Huang, X. A., and Lin, H. (2011). Drosophila Piwi functions in Hsp90-mediated suppression of phenotypic variation. *Nature genetics*, 43(2), 153-160.
- Gao, J., Wu, N., Liu, X., Xia, Y., Chen, Y., Li, S., and Deng, Z. (2018). MicroRNA-142-3p inhibits cell proliferation and chemoresistance in ovarian cancer via targeting sirtuin 1. *Experimental and therapeutic medicine*, 15(6), 5205-5214.
- Gefen, N., Binder, V., Zaliova, M., Linka, Y., Morrow, M., Novosel, A., Edry, L., Hertzberg, L., Shomron, N., Williams, O., Trka, J., Borkhardt, A., and Izraeli, S. (2010). Hsa-mir-125b-2 is highly expressed in childhood ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) leukemias and confers survival advantage to growth inhibitory signals independent of p53. *Leukemia*, 24, 89-96.
- German, J. (1997). Bloom's Syndrome. XX. The First 100 Cancers. *Cancer Genet Cytogenet*, 93(1):100-6.

- Gökbuget, N., and Hoelzer, D. (2009). Treatment of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Seminars in Hematology*, 64-75.
- Gregory, P., Bert, A., Paterson, E., Barry, S., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas, M. A., Khew-Goodall, Y., and Goodall, G. J. (2008). The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature cell biology*, 593-601.
- Griffiths, S., Kaur, H., Stijn, v. D., and Enright, A. J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K., Nam, J., I, H., Rhee, J., Sohn, S. Y., Cho, Y., Zhang, B. T. and Kim, V. N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 887-901.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., and Kim, V. N. (2004). The Drosha–DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development*, 3016-3027.
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., Andrew Lister, T., and Bloomfield, C. D. (1999). World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting—Airlie House, Virginia, November 1997. *Journal of Clinical Oncology*, 17 (12): 3835-3849.
- Holmfeldt, L., Wei, L., Diaz-Flores, E., Walsh, M., Zhang, J., Ding, L., Payne-Turner, D., Churchman, M., Andersson, A., Chen, S. C., McCastlain, K., Becksfort, J., Ma, J., Wu, G., Patel, S. N., Heatley, S. L., Phillips, L. A., Song, G., Easton, J., Parker, M., Chen, X., Rusch, M., Boogs, K., Vadodaria, B., Hedlund, E., Drengberg, C., Baker, S., Pei, D., Cheng, C., Huether, R., Lu, C., Fulton, R. S., Fulton, L. L., Tabib, Y., Dooling, D. J., Ochoa, K., Minden, M., Lewis, I. D., Para, L. B., Marlton, P., Roberts, A. W., Raca, G., Stock, W., Neale, G., Drexler, H. G., Dickins, R. A., Ellison, D. W., Shurtleff, S. A., Pui, C. H., Ribeiro, R. C., Devidas, M., Carroll, A. J., Heerema, N. A., Wood, B., Borowitz, M. J., Gastier-Foster, J. M., Raimondi, S. C., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Downing, J. R., Hunger, S. P., Loh, M. L., and Mullighan, C. G. (2013). The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*, 45(3):242-252.

- Hu, Y., Zhu, Q., and Tang, L. (2014). Mir-99a antitumor activity in human breast cancer cells through targeting of mTOR expression. *PLoS One*.
- Huang, B., Zhao, J., Lei, Z., Shen, S., Li, D., Shen, G.-X., Zhang, G.-M., and Feng, Z.-H. (2009). miR-142-3p restricts cAMP production in CD4⁺ CD25⁺ T cells and CD4⁺ CD25⁺ TREG cells by targeting AC9 mRNA. *EMBO reports*, 10 (2): 180-185.
- Huang, T., Alvarez, A., Hu, B., and Cheng, S.-Y. (2013). Noncoding RNAs in cancer and cancer stem cells. *Chinese journal of cancer*, 32(11), 583-593.
- Huang, X., Tóth, F. K., and Aravin, A. A. (2017). piRNA biogenesis in *Drosophila Melanogaster*. *Trends in Genetics*, 33 (11): 882-894.
- Instituto Nacional de Cancer. (2018, Abril). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015*. Retrieved from https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/
- Isanchez-García, I., and Grutz, G. (1995). Tumorigenic activity of the BCR-ABL oncogenes is mediated by BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 5287-5291.
- Izaguirre, R., and de Micheli, A. (2005). Evolución del conocimiento de la sangre y su movimiento. Parte II. El saber sobre su composición. Iatroquímica de la sangre. *Revista de Investigación Clínica*, 57: 85-97.
- Jabbour, E. J., Faderl, S., and Kantarjian, H. M. (2005). Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clin Proc*, 80(11):1517-1527.
- Jiang, M., Li, X., Quan, X., Yang, X., Zheng, C., Hao, X., Qu, R., and Zhou, B. (2018). Mir-486 as an effective biomarker in cancer diagnosis and prognosis: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 9(17), 13948-13958.
- Kamminga, L. M., Luteijn, M. J., den Broeder, M. J., Redl, S., Kaaij, L. J., Roovers, E. F., Ladurner, P., Berezikov, E., and Ketting, R. F. (2010). Hen1 is required for oocyte development and piRNA stability in zebrafish. *The EMBO journal*, 29, 3688–3700.
- Kim, V., Han, J., & Siomi, M. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews*, 10, 126-139.
- Klattenhoff, C., Xi, H., Li, C., Lee, S., Xu, J., Khurana, J. S., Zhang, F., Schultz, N., Koppetsch, B. S., Nowosielska, A., Seitz, H., Zamore, P. D., Weng, Z., and Theurkauf, W. E. (2009).

- The *Drosophila* HP1 homolog Rhino is required for transposon silencing and piRNA production by dual-strand clusters. *Cell*, 138, 1137-1149.
- Krell, J., Frampton, A. E., Jacob, J., Pellegrino, L., Roca-Alonso, L., Zeloof, D., Alifrangis, C., Lewis, J. S., Jiao, L. R., Stebbing, J., and Castellano, L. (2012). The clinico-pathologic role of microRNAs miR-9 and miR-151-5p in breast cancer metastasis. *Molecular diagnosis & therapy*, 16(3), 167-172.
- Kung, J. T., Colognori, D., and Lee, J. T. (2013). Long Noncoding RNAs: Past, Present and Future. *Genetics*, 193: 651-669.
- Kurth, H., and Mochizuki, K. (2009). 2'-O-methylation stabilizes Piwi-associated small RNAs and ensures DNA elimination in *Tetrahymena*. *RNA*, 15, 675–685.
- Lau, N. C., Seto, A. G., Kim, J., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Bartel, D. P., and Kingston, R. E. (2006). Characterización of de piRNA Complex from Rat Testes. *Science*, 363-367.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambrost, V. (1993). The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*, Vol. 75, 843-854.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Chol, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425: 415-419.
- Lee, Y., Hur, I., Park, S., Kim, Y., Suh, M., and Kim, V. (2006). The role of PACT in the RNA silencing pathway. *The EMBO Journal*, 522-532.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., and Kim, V. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*, 4663-4670.
- Li, X. J., Luo, X. Q., Han, B. W., Duan, F. T., Wei, P. P., and Chen, Y. Q. (2013). MicroRNA-100/99a, deregulated in acute lymphoblastic leukaemia, suppress proliferation and promote apoptosis by regulating the FKBP51 and IGF1R/mTOR signalling pathways. *British Journal of Cancer*, 109, 2189-2198.
- LI, X. Z., Roy, C. K., Dong, X., Bolcun-Filas, E., Wang, J., Han, B. W., Xu, J., Moore, M. J., Schimenti, J. C., Weng, Z., and Zamore, P. D. (2013). An acient transcription factor initiates

- the Burst of piRNA production during early meiosis in mouse testes. *Molecular cell*, 50, 1-15.
- Li, Z., Luo, R. T., Mi, S., Sun, M., Chen, P., Bao, J., Neilly, M. B., Jayathilaka, N., Johnson, D. S., Wang, L., Lavau, C., Zhang, Y., Tseng, C., Zhang, X., Wang, J., Yu, J., Yang, H., Wang, S. M., Rowley, J. D., Chen, J., and Thirman, M. J. (2009). Consistent Deregulation of Gene Expression between Human and Murine MLL Rearrangement Leukemias. *Cancer Research*, 1109-1116.
- Liu, H., Cheng, E. H., and Hsieh, J. J. (2009). MLL fusions Pathways to leukemia. *Cancer Biology & Therapy*, 1204-1211.
- Liu, J., Shi, W., Wu, C., Ju, J., and Jiang, J. (2014). miR-181b as a key regulator of the oncogenic process and its clinical implications in cancer. *Biomedical Reports*, 2: 7-11.
- Liu, S., Song, L., Yao, H., Zhang, L., Xu, D., Li, Q., and Li, Y. (2018). Preserved miR-361-3p expression is an independent pronostic indicador of favorable survival in cervical cancer . *Disease markers*.
- Lodish, H. F., Chen, C.-Z., and Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation. *Science*, 83-86.
- Lu, J., Lu, S., Li, J., Yu, Q., Liu, L., and Li, Q. (2018). Mir-629-5p promotes colorectal cancer progression through targetting CXXC finger protein 4. *Bioscience Reports*, 38.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., and Kutay, U. (2004). Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science*, 95-98.
- Luteijn, M. J., and Ketting, R. F. (2013). PIWI-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics. *Nature*, 14, 523-534.
- Lv, M., Zhang, X., Jia, H., Li, D., Zhang, B., Zhang, H., Hong, M., Jiang, T., Jiang, Q., Lu, J., Huang, X., and Huang, B. (2012). An oncogenic role of miR-142-3p in human T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) by targeting glucocorticoid receptor-a and cAMP/PKA pathways. *Leukemia*, 769-777.
- Lynch, R. G. (2001). The Philadelphia Chromosome. *Milestones in Investigative Pathology*, (4): 1-2.

- Mavrakis, K. J., Wolfe, A. L., Oricchio, E., Palomero, T., de Keersmaecker, K., McJunkin, K., Zuber, J., James, T., Khan, A. A., Leslie, C. S., Parker, J. S., Paddison, P. J., Tam, W., Ferrando, A., and Wendel, H.G. (2010). Genome-wide RNA-mediated interference screen identifies miR-19 targets in Notch-induced T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Cell Biol*, 12(4), 372-379.
- Mets, E., Van der Meulen, J., Van Peer, G., Boice, M., Mestdagh, P., Van de Walle, I., Lammens, T., Goossens, S., De Moerloose, B., Benoit, Y., Van Roy, N., Clappier, E., Poppe, B., Vandesompele, J., Wendel, H. G., Taghon, T., Rondou, P., Soulier, J., Van Vlierberghe, P., and Speleman, F. (2014). MicroRNA-193b-3p acts as a tumor suppressor by targeting the MYB oncogene in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 1-9.
- Mi, S., Li, Z., Chen, P., He, C., Cao, D., Elkahoul, A., Lu, J., Pelloso, L. A., Wunderlich, M., Huang, H., Luo, R. T., Sun, M., He, M., Neilly, M. B., Zeleznik-Le, N. J., Thirman, M. J., Mulloy, J. C., Liu, P. P., Rowley, J. D., and Chen, J. (2010). Aberrant overexpression and function of the miR-17-92 cluster in MLL-rearranged acute leukemia. *PNAS*, 107(8), 3710-3715.
- Monteleone, N. J., and Lutz, C. S. (2017). miR-708-5p: a microRNA with emerging roles in cancer. *Oncotarget*, 8(41), 71292-71316.
- Moorman, A. V., Harrison, C. J., Buck, G. A., Richards, S. M., Secker-Walker, L. M., Martineau, M., Vance, G. H., Cherry, A. M., Higgins, R. R., Fielding, A. K., Foroni, L., Paietta, E., Tallman, M. S., Litzow, M. R., Wiernik, P. H., Rowe, J. M., Goldstone, A. H., and Dewald, G. W. (2007). Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*, 3189-3197.
- Mullighan, C., Collins-Underwood, J., Phillips, L. A., Loudin, M. G., Liu, W., Zhang, J., Ma, J., Coustan-Smith, E., Harvey, R. C., Willman, C. L., Mikhail, F. M., Meyer, J., Carroll, A. J., Williams, R. T., Cheng, J., Heerema, N. A., Basso, G., Pession, A., Pui, C-H., Raimondi, S. C., Hunger, S. P., Downing, J. R., Carroll, W. L., and Rabin, K. R. (2009). Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*, 41:1243-1246.

- Mullighan, C., Goorha, S., Radtke, I., Miller, C., Coustan-Smith, E., Dalton, J., Girtman, K., Mathew, S., Ma, J., Pounds, S. B., Su, X., Pui, C-H., Relling, M. V., Evans, W. E., Shurtleff, S. A., and Downing, J. R. (2007). Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, 446: 758-764.
- Mullighan, C., Miller, C., Radtke, I., Phillips, L., Dalton, J., Ma, J., White, D., Hughes, T. P., Le Beau, M. M., Pui, C-H., Relling, M. V., Shurtleff, S. A., and Downing, J. R. (2008). BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*, 110-114.
- Nowell, P., and Hungerford, D. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *JNCI*.
- Organización Mundial de la Salud. (2018, Septiembre 12). Retrieved from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Ortiz, C. (2013). Notas sobre la historia de la leucemia. *Patología*, 51: 58-69.
- Palomero, T., McKenna, K., O-Neil, J., Galinsky, I., Stone, R., Suzukawa, K., Stiakaki, E., Kalmanti, M., Fox, E. A., Caligiuri, M. A., Aster, J. C., Look, A. T., and Ferrando, A. A. (2006). Activating mutations in NOTCH1 in acute myeloid leukemia and lineage switch leukemias. *Leukemia*, 1963-1966.
- Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., Slack, F., Martindale, M. Q., Kuroda, M. I., Maller, B., Hayward, D. C., Ball, E. E., Degnan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E., and Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408: 86-89.
- Peng, F., Jiang, J., Yu, Y., Tian, R., Guo, X., Li, X., Shen, M., Xu, M., Zhu, F., Shi, C., Hu, J., Wang, M., and Qin, R. (2013). Direct targeting of SUZ12/ROCK2 by miR-200/c inhibits cholangiocarcinoma tumorigenesis and metastasis. *British Journal of Cancer*, 109, 3092-3104.
- Qiu, Z., Li, H., Wang, J., & Sun, C. (2017). miR-146a and miR-146b in the diagnosis and prognosis of papillary thyroid carcinoma. *Oncology Reports* , 2735-2740.

- Reinhart, B. j., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., and Gary, R. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403: 901-906.
- Roberts, K., Li, Y., Payne-Turner, D., Harvey, R., Yang, Y., Pei, D., McCastlain, K., Ding, L., Lu, C., Song, G., Ma, J., Becksfort, J., RuSch, M., Chen, S. C., Easton, J., Cheng, J., Boggs, K., Santiago-Morales, N., Iacobucci, I., Fulton, R. S., Wen, J., Valentine, M., Cheng, C., Paugh, S. W., Devidas, M., Chen, I. M., Reshmi, S., Smith, A., Hedlund, E., Gupta, P., Nagahawatte, P., Wu, G., Chen, X., Yergeau, D., Vadodaria, B., Mulder, H., Winick, N. J., Larsen, E. C., Carroll, W. L., Heerema, N. A., Carroll, A. J., Grayson, G., Tasian, S. K., Moore, A. S., Keller, F., Frei-Jones, M., Whitlock, J. A., Raetz, E. A., White, D. L., Hughes, T. P., Guidry Auvil, J. M., Smith, M. A., Marcucci, G., Bloomfield, C. D., Mrózek, K., Kohlschmidt, J., Stock, W., Kornblau, S. M., Konopleva, M., Paietta, E., Pui, C. H., Jeha, S., Relling, M. W., Evans, W. E., Gerhard, D. S., Gastier-Foster, J. M., Mardis, E., Wilson, R. K., Loh, M. L., Downing, J. R., Hunger, S. P., Willman, C. L., Zhang, J., and Mullighan, C. G. (2014). Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 371(11):1005-1015.
- Roberts, K., Morin, R., Zhang, J., Hirst, M., Zhao, Y., Su, X., Chen, S-C., Payne-Turner, D., Churchman, M. L., Harvey, R. C., Chen, X. Kasap, C., Yan, C., Becksfort, J., Finney, R. P., Teachey, D. T., Maude, S.L., Tse, K., Moore, R., Jones, S., Mungall, K., Birol, I., Edmonson, M. N., Hu, Y., Buetow, K. E., Chen, I-M., Carroll, W. L., Wei, L., Ma, J., Kleppe, M., Levine, R. L., Garcia-Manero, G., Larsen, E., Shah, N. P., Devidas, M., Reaman, G., Smith, M., Paugh, S. W., Evans, W. E., Grupp, S. A., Jeha, S., Pui, C-H., Gerhard, D. S., Downing, J. R., Willman, C. L., Loh, M., Hunger, S. P., Marra, M. A., and Mullighan, C. G. (2012). Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer cell*, 153-166.
- Rowe, J. M. (2010). Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 150, 389–405.
- Rowe, J. M., Buck, G., Burnett, A. K., Chopra, R., Wiernik, P. H., Richards, S. M., Lazarus, H. M., Franklin, I. M., Litzow, M. R., Ciobanu, N., Grant Prentice, H., Durrant, J., Tallman, M. S., and Goldstone, A. H. (2005). Induction therapy for adults with acute lymphoblastic

- leukemia: results of more than 1500 patients from the international ALL trial: MRC UKALL XII/ECOG E2993. *Blood*, 106(12):3760-3767.
- Scherr, M., Elder, A., Battmer, K., Barzan, D., Bomken, S., Rieke-Hoch, M., Schröder, A., Venturini, L., Blair, H. J., Vormoor, J., Ottmann, O., Ganser, A., Pich, A., Hilfiker-Kleiner, D., Heidenreich, O., and Eder, M. (2014). Differential expression of miR-17~92 identifies BCL2 as a therapeutic target in BCR-ABL-positive B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 28, 554-565.
- Schotte, D., Akbari Moqadam, F., Lange-Turenhout, E., Chen, C., van IJcken, W., Pieters, R., and den Boer, M. (2011). Discovery of new microRNAs by small RNAome deep sequencing in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 25, 1389-1399.
- Schotte, D., Chau, J., Sylvester, G., Liu, G., Chen, C., van der Velden, V. H. J., Broekhuis, M. J. C., Peters, T. C. J. M., Pieter, R., and den Boer, M. L. (2009). Identification of the new microRNA genes and aberrant microRNA profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 23, 213-322.
- Schotte, D., Lange-Turenhout, E. A., Stumpel, D. J., Stam, R. W., Buijs-Gladdines, J. G., Meijerink, J. P., Pieters, R., and Den Boer, M. L. (2010). Expression of miR-196b is not exclusively MLL-driven but is especially linked to activation of HOXA genes in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 95(10):1675-1682.
- Sehgal, S., Mujtaba, S., Gupta, D., Aggarwal, R., and Marwaha, R. K. (2010). High incidence of Epstein Barr virus infection in childhood acute lymphocytic leukemia: A preliminary study. *Indian J Pathol Microbiol*, 53:63-67.
- Seufert, W., and Seufert, W. D. (1982). The Recognition of Leukemia as a Systemic Disease. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, (1): 34-50.
- Sol, X., Dai, G., Yu, L., Hu, Q., Chen, J., and Guo, W. (2018). miR-143-3p inhibits the proliferation, migration and invasion in osteosarcoma by targeting FOSL2. *Scientific Reports*, 8(606).
- Sonoki, T., Iwanaga, E., Mitsuya, H., and Asou, N. (2005). Insertion of microRNA-125b-1, a human homologue of lin-4, into a rearranged immunoglobulin heavy chain gene locus in a patient with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 19, 2009-2010.

- Stumpel, D., Schotte, D., Lange-Turenhout, E., Schneider, P., Seslija, L., de Menezes, R. X., Marquez, V. E., Pieters, R., den Boer, M. L., and Stam, R. W. (2011). Hypermethylation of specific microRNA genes in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia: major matters at a micro scale. *Leukemia*, 429-439.
- Terwilliger, T., and Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blond Cancer Journal*, 7, e577;doi:10.1038/bcj.2017.53.
- Thammaiah, C. K., and Jayaram, S. (2016). Role of the let-7 family in breast cancer. *Non-coding RNA research*, 77-82.
- Trimarchi, T., Bilal, E., Ntziachristos, P., Fabbri, G., Dalla-Favera, R., Tsigirgos, A., and Aifantis, I. (2014). Genome-wide Mapping and Characterization of Notch-Regulated Long Noncoding RNAs in Acute Leukemia. *Cell*, 593-606.
- van Dongen, J. J., van der Velden, V. H., Brüggemann, M., and Orfao, A. (2015). Minimal residual disease (MRD) diagnostics in acute lymphoblastic leukemia (ALL): need for sensitive, fast and standardized technologies. *Blood*, 3996-4009.
- Ventura, A., Young, A. G., Winslow, M. M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S. J., Newman, J., Bronson, R. T., Crowley, D., Stone, J. R., Jaenisch, R., Sharp, P. A., and Jacks, T. (2008). Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17~92 family of miRNA clusters. *Cell*, 132, 875-886.
- Wallaert, A., Van Looche, W., Hernandez, L., Taghon, T., Speleman, F., and Van Vlierberghe, P. (2017). Comprehensive miRNA expression profiling in human T-cell acute lymphoblastic leukemia by small RNA-sequencing. *Nature*, 1-8.
- Watanabe, T., Takeda, A., Tsukiyama, T., Mise, K., Okuno, T., Sasaki, H., Minami, N., and Imai, H. (2006). Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes & Development*, 20 (13), 1732-1743.
- Weng, W., Li, H., and Goel, A. (2019). Piwi-interacting RNAs (piRNAs) and cancer: Emerging biological concepts and potential clinical implications. *BRA-Reviews on Cancer*, 160-169.

- Wu, S., Liu, F., Xie, L., Peng, Y., Lv, X., Zhu, Y., Zhang, Z., and He, X. (2015). miR-125b suppresses proliferation and invasion by targeting MCL1 in gastric cancer. *BioMed Research International*.
- Yamanaka, Y., Tagawa, H., Takahashi, N., Watanabe, A., Guo, Y.-M., Iwamoto, K., Yamashita, J., Saitoh, H., Kameoka, Y., Shimizu, N., Ichinohasama, R., and Sawada, K.-I. (2009). Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. *Blood*, 114(15), 3265-3275.
- Ye, H., Liu, X., Lv, M., Wu, Y., Kuang, S., Gong, J., Yuan, P., Zhong, Z., Li, Q., Jia, H., Sun, J., Chen, Z., and Guo, A.-Y. (2012). MicroRNA and transcription factor co-regulatory network analysis reveals miR-19 inhibits CYLD in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nucleic Acids Research*, 40(12), 5201-5214.
- Yuan, T., Huang, X., Woodcock, M., Du, M., Dittmar, R., Wang, Y., Tsai, S., Kohli, M., Boardman, L., Patel, T., and Wang, L. (2016). Plasma extracellular RNA profiles in healthy and cancer patients. *Scientific Reports*, 6: 19413.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., and Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, 1-12.
- Zuurbier, L., Petricoin, E. F., Vuerhard, M. J., Calvert, V., Kooi, C., Buijs-Gladdines, J. G., and Meijerink, J. P. (2012). The significance of PTEN and AKT aberrations in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 1405-1413.