



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

IDENTIFICACIÓN DE miRNAs ESPECÍFICOS DE EXOSOMAS SALIVALES EN PACIENTES CON CÁNCER PEDIÁTRICO

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS
PRESENTA:
ROSA NICTÉ-HA GUZMÁN HERNÁNDEZ**

**TUTOR PRINCIPAL:
DRA. GABRIELA ELISA MERCADO CELIS
LABORATORIO DE GENÓMICA CLÍNICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN, FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM.**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
MTRA. LILIANA VELASCO HIDALGO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

Ciudad Universitaria, CD. MX. JUNIO 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

IDENTIFICACIÓN DE miRNAs ESPECÍFICOS DE EXOSOMAS
SALIVALES EN PACIENTES CON CÁNCER PEDIÁTRICO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
ROSA NICTÉ-HA GUZMÁN HERNÁNDEZ

TUTOR
DRA. GABRIELA ELISA MERCADO CELIS
LABORATORIO DE GENÓMICA CLÍNICA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN,
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:
DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA
MTRA. LILIANA VELASCO HIDALGO

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2022.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora la Dra. Gabriela Elisa Mercado Celis, por brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto de investigación, por su confianza y apoyo.

A mi Comité Tutor: Dra. Liliana Velasco y Dr. Jorge Meléndez, por su tiempo y dedicación para la revisión de avances semestrales.

A la Dra. Yalbi Itzel Balderas Martínez por haberme asesorado en el análisis bioinformático, gracias por su tiempo y dedicación.

A la Dra. Alejandra Cervantes Garduño por sus enseñanzas y apoyo en este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser la institución que da garantía a la educación pública.

A mi familia y amigos, por su amor y apoyo incondicional.

ÍNDICE

1	RESUMEN.....	6
2	ANTECEDENTES.....	8
2.1	SALIVA COMO HERRAMIENTA DE DIAGNÓSTICO.....	8
2.2	EXOSOMAS SALIVALES.....	10
2.3	MICRORNA (MIRNA).....	13
2.4	MIRNAS EN CÁNCER.....	15
2.5	MIRNAS DE EXOSOMAS.....	17
2.6	MIRNAS DE EXOSOMAS EN CÁNCER PEDIÁTRICO.....	17
2.7	MIRNAS DE EXOSOMAS SALIVALES EN CÁNCER COMO BIOMARCADORES.....	19
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
4	JUSTIFICACIÓN.....	21
5	OBJETIVOS.....	22
6	HIPÓTESIS.....	22
7	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
7.1	FASE 1.....	23
7.1.1	Descripción del estudio:.....	23
7.1.2	Colección y procesamiento de saliva.....	23
7.1.3	Aislamiento de exosomas salivales.....	23
7.1.4	Caracterización de exosomas salivales.....	24
7.1.5	Extracción de ARN de exosomas salivales.....	26
7.1.6	Elaboración de bibliotecas de miRNAs de exosomas salivales.....	26
7.1.7	Secuenciación de miRNAs de exosomas salivales.....	27
7.1.8	Análisis Bioinformático.....	27

7.2	FASE 2	28
7.2.1	Descripción del estudio:.....	28
7.2.2	Variables.....	28
7.2.3	Descripción de la población.....	29
7.2.4	Tamaño de la muestra	29
7.2.5	Criterios de selección para casos y controles.....	29
7.2.6	Consideraciones éticas.....	30
7.2.7	Extracción de microRNAs de los casos y controles	31
7.2.8	Elaboración de bibliotecas y secuenciación de los casos y controles .	31
8	RESULTADOS.....	32
9	DISCUSIÓN	49
10	CONCLUSIÓN	53
ANEXO 1	54
ANEXO 2	55
ANEXO 3	60
11	REFERENCIAS.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biogénesis, carga y secreción de exosomas.....	12
Figura 2. Biogénesis del microRNA.....	15
Figura 3. Flujo de trabajo del análisis bioinformático.....	28
Figura 4. Exosomas y geles de poliacrilamida.....	32
Figura 5. Detección de proteínas exosómicas HSP70, CD63, CD9 y CD81.....	33
Figura 6. Detección de proteínas exosómicas CD63, CD9 y GAPDH.....	34
Figura 7. TEM de exosomas salivales.....	34
Figura 8. TEM de exosomas salivales aislados de un paciente con LAL.....	35
Figura 9. TEM de exosomas salivales aislados de un paciente con LNH.....	35
Figura 10. TEM de exosomas de un paciente con LAL empleando tinción negativa.	36
Figura 11. Gel de acrilamida al 6%, teñido con bromuro de etidio.....	38
Figura 12. miR-221 y miR-375 asociados con vías de señalización en diferentes tipos de cáncer (obtenida vía KEGG).....	42
Figura 13. Selección de muestras.....	43
Figura 14. Integridad del cDNA de las bibliotecas.....	48

1 RESUMEN

En México, el cáncer es la principal causa de muerte entre niños de 5 y 14 años por enfermedad. La saliva humana es un biofluido en donde se pueden encontrar exosomas, que son pequeñas vesículas celulares cuyo tamaño va de 30-150 nm, son secretados por todo tipo celular, contienen proteínas, lípidos y ácidos nucleicos como miRNAs, que desempeñan un papel central en la regulación de la expresión génica y su expresión aberrante en cáncer. La evidencia de que las células tumorales se comunican a través de la secreción de miRNAs en los fluidos corporales y que estas moléculas pueden empaquetarse en exosomas y entregarse a las células diana ha abierto escenarios interesantes para el uso de estas moléculas como nuevos biomarcadores. El objetivo de este estudio es evaluar la identificación por medio de secuenciación masiva paralela de miRNAs de exosomas salivales en pacientes con cáncer pediátrico.

En este estudio se establecieron las condiciones para el análisis de miRNAs derivados de exosomas salivales. Se aislaron y caracterizaron exosomas salivales, mediante los marcadores exosomales CD63, CD9, CD81, Hsp70 y GAPDH como control positivo, las micrografías electrónicas confirmaron que las vesículas aisladas corresponden a exosomas salivales. Posteriormente se realizó la estandarización de la extracción de RNA de exosomas salivales a partir de la comparación de 4 kits, donde miRNeasy (15.01 ng/ μ L \pm 7.78) y miRVANA (15.37 ng/ μ L \pm 3.64), presentaron las concentraciones más altas de RNA. En el ensayo de elaboración de bibliotecas y secuenciación se determinó que la concentración necesaria de miRNAs exosomales debe ser >0.18 ng/ μ L y se obtiene a partir de un volumen inicial de 1 mL de sobrenadante de saliva. La estandarización del protocolo de análisis bioinformático se llevó a cabo en dos muestras, un caso de Leucemia Aguda Linfoblástica y su respectivo control. Las lecturas presentaron una calidad superior a 30 en escala Phred, se alinearon utilizando los programas BWA, Bowtie 1 y Bowtie 2. Los parámetros de BWA (-t 10 sampe) mostraron los porcentajes más altos de alineamiento 7.63% (caso) y 3.55% (control). El análisis mostró la expresión de seis miRNAs en el caso miR221, miR6746, MIR137HG, MIR4300HG, MIR4435-

2HG y MIR762HG. En la muestra control se identificaron la expresión de tres miRNAs, miR375, MIR3667HG y MIR663AHG. El estudio preliminar permitió establecer los parámetros necesarios para futuros ensayos de miRNAs de exosomas salivales.

2 ANTECEDENTES

2.1 Saliva como herramienta de diagnóstico

La saliva es un biofluido incoloro, inodoro y tiene un pH de 6.6-7. Está compuesta por secreciones de las tres glándulas salivales mayores (parótida, submandibular y sublingual) y numerosas glándulas menores (labiales, bucales, linguales y palatinas), la combinación de estas secreciones, incluido el fluido crevicular gingival se denomina saliva total. La saliva presenta muchas funciones biológicas: limpieza y protección de la boca, digestión de alimentos, homeostasis, acción amortiguadora, remineralización del esmalte, entre otras (1, 2).

Cada glándula salival es altamente permeable y está envuelta por capilares, lo que permite el libre intercambio de moléculas provenientes del torrente sanguíneo en las células acinares productoras de saliva. Diversos investigadores postulan que las moléculas derivadas de la sangre ingresan a las glándulas salivales a través de rutas transcelulares (transporte pasivo y activo) o paracelulares (ultrafiltración extracelular). En consecuencia, la saliva puede contener información molecular capaz de comunicar el estado de salud actual de un individuo. En promedio, la salivación individual puede variar de 0.3-0.7 mL de saliva por minuto, produciendo un rango de 0.5-1.5 L diarios (2-4).

La composición de la saliva es 99% agua y un 1% de otros componentes orgánicos e inorgánicos, como: ácidos nucleicos, péptidos, urea, amoníaco, ácido úrico, glucosa, colesterol, ácidos grasos, triglicéridos, lípidos neutros, glicolípidos, aminoácidos, hormonas esteroideas, mucina, amilasa, lectina, lisozima, peroxidasa, lactoferrina y glicoproteínas, así como altas concentraciones de Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , K^+ , HCO_3^- , H_2PO_4^- , F^- , I^- y Mg^{2+} . Todos estos componentes se originan en múltiples fuentes locales y sistémicas, también presenta más de 700 microorganismos que están relacionados con enfermedades orales y sistémicas, por lo tanto, la saliva es una fuente amplia de biomarcadores (5-7).

¿Qué es un biomarcador?, el Instituto Nacional de Salud (INH) ha definido al biomarcador como un indicador medido y evaluado objetivamente de procesos

biológicos, fisiológicos, patológicos o terapéuticos; los biomarcadores son componentes dentro del cuerpo capaces de brindar información importante sobre el estado fisiológico actual de un organismo vivo (8, 9). Pueden ser anticuerpos, microorganismos, ADN, ARN, lípidos, proteínas y metabolitos. Una colección de biomarcadores confiables y reproducibles únicos para ciertas enfermedades a menudo se denomina firma molecular. Comprender y evaluar la importancia de los biomarcadores de un individuo puede ser útil para la detección, diagnóstico, caracterización, seguimiento y pronóstico de enfermedades. Por esta razón, son una herramienta valiosa (10).

Los biomarcadores descubiertos en cualquiera de las herramientas "ómicas" (proteoma, transcriptoma, metaboloma, microbioma o epigenoma) están sujetos a evaluaciones integrales, la literatura refiere tres pasos para la evaluación y validación de biomarcadores:

- 1) Desarrollo de biomarcadores, incluye la evaluación en el laboratorio de la sensibilidad, confiabilidad y precisión del ensayo. El objetivo es optimizar los protocolos de ensayo y adquisición de muestras.
- 2) Caracterización de biomarcadores, evalúa la variabilidad de biomarcadores en la población humana, determina interacciones relevantes y factores de confusión potenciales.
- 3) Estudios longitudinales, tiene como objetivo evaluar la presencia de una relación causal entre un biomarcador y su enfermedad asociada mediante el uso de estudios epidemiológicos (11).

Al igual que la sangre, la saliva es un fluido corporal complejo que contiene una amplia gama de componentes moleculares. El suero o plasma sanguíneo se ha considerado tradicionalmente como una fuente de biomarcadores medibles, pero los procedimientos necesarios para recolectar y eventualmente analizar las muestras de sangre a menudo pueden ser costosos, problemáticos e invasivos. Entre las ventajas que se han considerado acerca del uso de la saliva sobre la sangre como método de diagnóstico podemos considerar: la colección de muestra es sencilla, el muestreo de sangre requiere personal altamente capacitado, cualquier persona puede obtener saliva, incluida la autorecolección. Es un

procedimiento no invasivo y no doloroso lo que reduce la incomodidad que la mayoría de las personas experimentan con biopsias y extracciones de sangre repetidas, lo que anima a otros a participar en evaluaciones y exámenes médicos oportunos. Las muestras son seguras de manejar empleando las barreras de protección indicadas. También son fáciles de almacenar, requieren menos manipulación que las muestras de sangre y el procedimiento es económico (4).

El estudio de la salivaómica es un campo relativamente nuevo, el término salivaómica fue acuñado en 2008 para reflejar los diversos conocimientos sobre las tecnologías ómicas en saliva, se ha demostrado que la saliva es útil para la detección y diagnóstico de tumores, infecciones, enfermedades cardíacas y autoinmunes. También, estudios previos han demostrado que en la saliva podemos encontrar vesícula extracelulares (EV), que contienen una variedad de biomoléculas como mRNA, microRNA y proteínas. La bicapa lipídica protege su contenido, proporcionando un medio para la detección de posibles biomarcadores clínicamente relevantes que son más estables y precisos (3, 12-15).

2.2 Exosomas salivales

Existen tres clases principales de vesículas extracelulares (EV): microvesículas, cuerpos apoptóticos y exosomas, que se diferencian en función de su tamaño, contenido y mecanismo de formación. Los exosomas son nanovesículas formadas por una bicapa lipídica, polisacáridos y receptores, tienen un tamaño de 30 a 150 nm y contienen una composición específica de proteínas, enzimas, lípidos, ADN, mRNA, microRNA, piRNA y otros ARNs no codificantes (2, 16-19). Son secretados por cualquier tipo celular y están presentes en una variedad de fluidos corporales que incluyen sangre, plasma (20), leche materna (21), orina (22), líquido amniótico (23) y saliva (24).

Los exosomas pueden transferir señales a las células receptoras, mediando así un mecanismo de comunicación de célula a célula, también por su contenido genético pueden regular una variedad de vías celulares a través de la expresión de múltiples genes diana en células receptoras y como modificadores de la respuesta inmune al ser secretados por muchos tipos de células tumorales (25).

En cuanto a su biogénesis (figura 1), la formación de exosomas está altamente regulada por la activación de receptores específicos de células y vías de señalización. El mecanismo más común es la vía endosomal, que inicia con la fusión de vesículas endocíticas que da como resultado la formación de endosomas primarios, los cuales reciben su carga endocítica por vías independientes o dependientes de clatrina o caveolina (26). El endosoma primario pasa por dos vías, ya sea devolviendo la carga a la membrana plasmática como "endosoma de reciclaje" o madurando a un endosoma tardío, que puede intercambiar vesículas bidireccionalmente con el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico. El tráfico endosomal está regulado a través de Rab GTPasas específicas (Rab5 y Rab7a), las cuales identifican y regulan la progresión de macromoléculas endocitosadas y receptores de membrana plasmática. En los endosomas tardíos Rab7a, junto con el complejo hVPS34/p150 regulan la señalización del fosfatidilinositol que es importante para la clasificación de proteínas y para la invaginación de la membrana del endosoma tardío que forma las vesículas intraluminales (ILV), contenidas en el cuerpo multivesicular (MVB) (18, 27). La formación de los MVB y las ILV es iniciado por el complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT), que se compone de una serie de proteínas que se ensamblan en cuatro complejos (ESCRT 0, I, II y III) con proteínas asociadas como VTA1 y Alix. El MVB puede fusionarse con la membrana plasmática y liberar ILV al espacio extracelular como exosomas. Por otro lado, el MVB también puede ser transportado a un lisosoma para la posterior degradación de su contenido (28).

Ogawa y col. encontraron por primera vez exosomas en la saliva, posteriormente se conoció que los exosomas se liberan en la saliva a través de células ductales o acinares y que eran vesículas fisiológicamente activas (29). De acuerdo con su tamaño y composición proteica Ogawa clasifica a los exosomas salivales en dos tipos: exosomas I (diámetro promedio 83.5 nm) y II (diámetro promedio 40.5 nm). Identificaron 101 proteínas en exosomas I y 154 proteínas en exosomas II y 68 proteínas que incluyen marcadores comunes como CD63, CD9, Alix, Tsg101 y Hsp70 en ambos grupos. Aproximadamente el 40% de las proteínas identificadas fueron proteínas extracelulares (cadenas de inmunoglobulina) o secretoras

(albúmina sérica), lo que indica que la saliva contiene vesículas que se originan en los linfocitos circulantes y fluido intravascular (30-32).

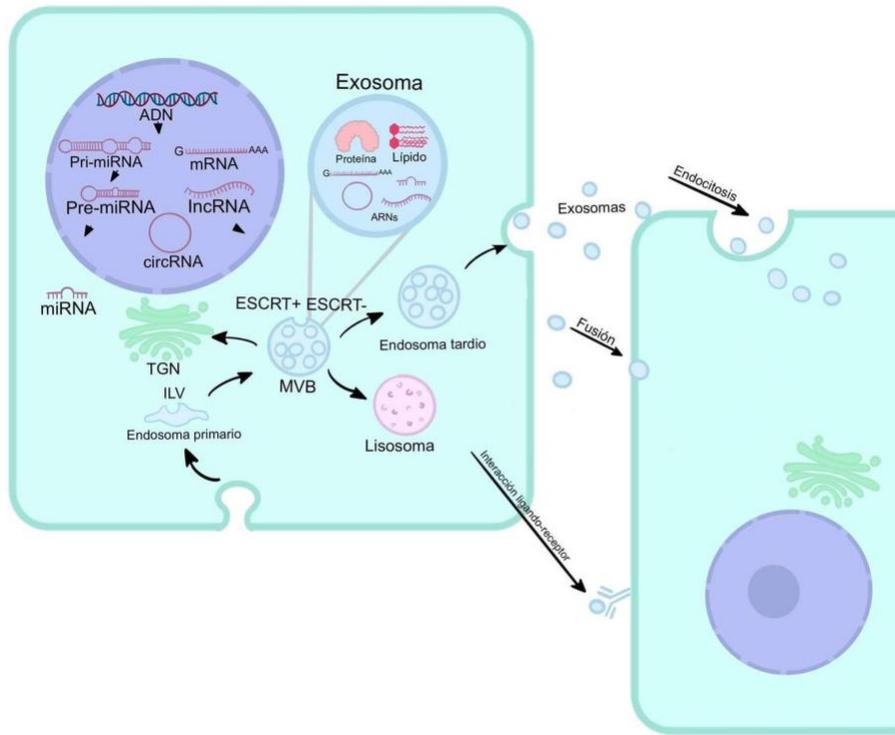


Figura 1. Biogénesis, carga y secreción de exosomas.

Los exosomas se forman por la invaginación de la membrana endocítica y la formación de ILV dentro de la célula. Durante la maduración, las cargas (ARN, proteínas y lípidos) se incorporan a ILV a través de vías dependientes o independientes de ESCRT, la maduración de los endosomas tempranos da lugar a MVB. Los MVB pueden transportarse a la red trans-Golgi para el reciclaje de endosomas, entregarse a los lisosomas para su degradación o moverse a lo largo de los microtúbulos para fusionarse con la membrana plasmática y liberar exosomas en el espacio extracelular.

Los numerosos estudios proteómicos y transcriptómicos de EVs en diferentes organismos, han producido bases de datos de proteínas, ARNs y lípidos que podemos encontrar en exosomas de diferentes tipos celulares, tejidos y biofluidos, como en Vesiclepedia (www.microvesicles.org) y ExoCarta (www.exocarta.org) (33, 34). Los exosomas se han aislado y caracterizado a partir de diferentes tipos celulares en condiciones normales y de estrés. Los métodos más utilizados para el aislamiento de exosomas incluyen la ultracentrifugación y kits comerciales

disponibles para la extracción de exosomas. La Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares ha publicado recientemente los requisitos experimentales mínimos para la definición de vesículas extracelulares aisladas (35):

1. Morfología: La microscopía electrónica de transmisión y de barrido (TEM y SEM), microscopía de fuerza atómica (AFM), se utilizan con frecuencia para caracterizar los exosomas aislados, cuya morfología debe ser redonda con un diámetro entre los 30-150 nm.
2. Para la caracterización de exosomas basada en el contenido de proteínas deben analizarse al menos 3 marcadores proteicos, incluyendo una proteína de las diferentes categorías, proteína transmembranal, proteínas citosólicas, proteínas intracelulares, ya sea por Western blot o citometría de flujo.

2.3 microRNA (miRNA)

Los microRNAs son una familia de pequeños ARNs no codificantes que tienen una longitud de 18 a 25 nucleótidos. Están codificados en genomas y conservados en eucariotas, los primeros miRNAs que se reportaron fueron lin-4 y let-7, identificados en el nematodo *C. elegans* en 1993 y 2000, respectivamente (36, 37). Actualmente se han identificado aproximadamente 2000 miRNAs que están codificados en el genoma humano (<http://www.mirbase.org>). Los miRNAs están involucrados en la regulación del desarrollo, homeostasis, diferenciación, proliferación y apoptosis, actúan regulando la expresión génica postranscripcional (38-40). La biogénesis de los miRNAs (figura 2) inicia con la transcripción del gen mediado por la RNA polimerasa II o III, formando el primer transcrito primario largo (pri-miRNA) que tiene una estructura cap 5' y cola de poli-A 3' (41, 42), este transcrito tiene que pasar por una serie de cambios provocados por varias enzimas para formar los miRNAs maduros; estando en el núcleo el pri-miRNA es dividido por medio de un micropocesador compuesto por DGCR8 y RNasa III Drosha, generando un miRNA precursor (pre-miRNA) con estructura de tallo-horquilla integrado por 60-85 nucleótidos. Los dominios RIIIDa y RIIIDb de Drosha forman un dímero intramolecular y escinden las hebras 3' y 5' del tallo del pri-miRNA, respectivamente. DGCR8 también tiene dos dominios de unión a ARN de doble cadena, es un

componente esencial que permite a Drosha posicionarse correctamente en el pri-miRNA (43). Además, Drosha facilita la tasa de producción general de miRNAs al generar los extremos sobresalientes 3', que son reconocidos eficientemente por Exportina-5 y Dicer (44). También se sabe que la metiltransferasa 3 aumenta la producción de miRNAs, metila los pri-miRNA, marcándolos (m6A) para su reconocimiento y procesamiento por DGCR8 (45).

El pre-miRNA es pasado del núcleo al citoplasma por medio del complejo Ran/GTP/Exportina-5, una vez estando en el citoplasma la molécula de GTP es hidrolizada a GDP y el pre-miRNA es liberado del complejo exportador (46, 47), es aquí donde el complejo Dicer-TRBP se une al pre-miRNA, corta el extremo en horquilla permitiendo la división y formando una doble cadena de 20-22 nucleótidos que posteriormente se separa, las interacciones Dicer-TRBP contribuyen a la longitud adecuada del miRNA y a la selección de hebras en un subconjunto de miRNAs de mamíferos (48). Al separarse las cadenas, una cadena es degradada o puede unirse a receptores tipo Toll desencadenando vías de señalización downstream (49, 50), la otra cadena se denomina miRNA maduro, el cual se une a una familia de proteínas argonautas (AGO) y forman el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), hasta el ARN mensajero (mRNA) blanco. Los miRNAs actúan por dos mecanismos: la degradación del mRNA si la complementariedad es perfecta, e inhibición de la traducción si la complementariedad es imperfecta. Las interacciones entre el miRNA y el mRNA están mediadas por la región semilla, un fragmento de 6 a 8 nucleótidos de largo en el extremo 5' del miRNA dirigiéndose a regiones específicas 3'-UTR de sus transcritos de mRNA (49, 50). Sin embargo, Helwak y col. identificaron recientemente grupos de unión no canónicos adicionales independientes de la región semilla utilizando una técnica CLASH imparcial (51). Cada miRNA puede llegar directa o indirectamente a cientos de transcritos y proteínas, más de un miRNA puede converger en un solo transcrito objetivo, son capaces de actuar como regulador principal de diferentes procesos, por lo tanto, se pueden usar como biomarcadores de estados fisiológicos y patológicos (52, 53).

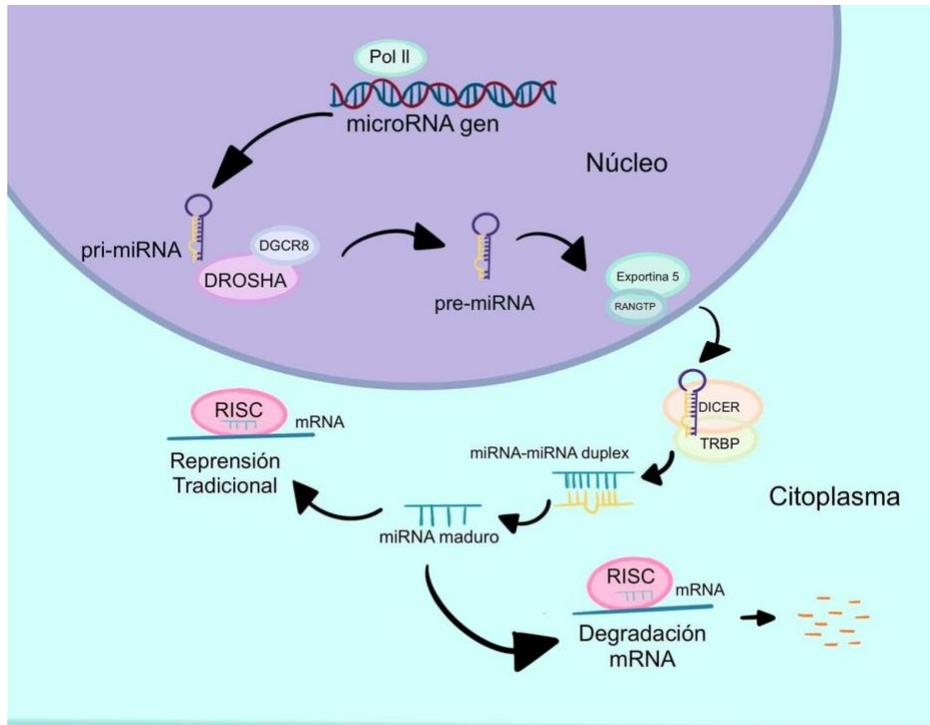


Figura 2. Biogénesis del microRNA.

Los genes de miRNA generalmente son transcritos por la RNA polimerasa II para producir los transcritos pri-miRNA, que son escindidos por DGCR8 y Drosha generando un pre-miRNA. Después son transportados por el complejo Ran/GTP/Exportina 5 del núcleo al citoplasma, los pre-miRNA son procesados por Dicer a un dúplex miRNA/miRNA de 20–22 nt. El miRNA maduro se incorpora a un complejo denominado RISC para mediar el silenciamiento génico a través de la escisión y degradación del mRNA o represión de la traducción.

2.4 miRNAs en cáncer

El cáncer es una enfermedad multifactorial compleja, se inicia por cambios genéticos y epigenéticos acumulativos en una célula normal. Sin embargo, el microambiente tisular ejerce efectos poderosos para determinar la progresión frente a la latencia o destrucción de una célula iniciada oncogénicamente. Como propusieron Hanahan y Weinberg, las células normales adquieren una serie de características a medida que se transforman en células cancerosas. Para que las células cancerosas prosperen deben permanecer en un estado proliferativo, sobrevivir a pesar de las condiciones adversas del entorno, provocar angiogénesis local, invadir otros tejidos, hacer metástasis y evadir el reconocimiento del sistema inmunológico del cuerpo (54).

Hasta la fecha, se han identificado múltiples miRNAs en varios tipos de cáncer (Anexo 1), se ha demostrado que los miRNAs están ampliamente desregulados, lo que destaca su importante papel en la aparición, crecimiento y metástasis de los tumores (52, 55). Además, la expresión diferencial de miRNAs puede ser correlacionada con el tipo de cáncer, estadio y otras variables clínicas, por lo que la identificación de miRNAs son un potencial biomarcador para el diagnóstico, pronóstico y en el tratamiento terapéutico contra el cáncer (53).

Los miRNAs asociados a tumores se pueden clasificar en dos grupos en función de su efecto modulador sobre la expresión de sus genes diana: miRNAs supresores de tumores (TS-miRNA) y miRNAs oncogénicos (oncomiR) (56,57). Varios experimentos y análisis clínicos sugieren que la regulación al alza de los miRNAs oncogénicos bloquea los genes supresores de tumores y conduce a la formación de tumores. Por el contrario, la regulación a la baja de miRNAs con función de supresores de tumores aumenta la traducción de oncogenes (58).

Numerosos TS-miRNAs están subregulados en los tejidos cancerosos; tras la reexpresión, suprimen varios procesos relevantes para la tumorigénesis, incluida la proliferación, apoptosis y migración (59-67). Por ejemplo, miR-34a inhibe la proliferación y migración del cáncer de mama a través de la regulación negativa de BCL-2 y SIRT1 (59). Los mir-15 y mir-16 se encuentran eliminados o regulados a la baja en la leucemia linfocítica crónica, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga y otros tumores sólidos, suprimen BCL2 desencadenando la apoptosis, también se dirige a otros oncogenes, como ciclina D1, MCL1, CDC2, ETS1 y JUN, que están involucrados en la progresión del cáncer (60-62).

Los onco-miRNAs en cambio están sobreexpresados, suelen promover el desarrollo de tumores al inhibir negativamente los genes supresores de tumores o los genes que controlan la diferenciación celular y la apoptosis. El miR-21, se sobreexpresa en varios tipos de cáncer: pulmón, mama, estómago, próstata, colon, páncreas y glioblastoma, modula la tumorigénesis a través de la regulación de SPRY2, PTEN, RECK, TIMP3, BCL2 y PDC4 y la actividad antiapoptótica (68-70). Los miembros del grupo miR-17-92 (miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18, miR-19a, miR-19b1, miR-20 y miR-92) representan un grupo muy estudiado, promueven supervivencia celular,

la rápida proliferación y angiogénesis. Están involucrado en neoplasias malignas hematopoyéticas como linfoma de Burkitt y leucemia linfocítica crónica (71), en cáncer de pulmón de células pequeñas (72) y hepatoma (73).

2.5 miRNAs de exosomas

Se ha reportado que la mayoría de los miRNAs se encuentran dentro de exosomas en suero y muestras de saliva humana (2, 74). El perfil de miRNA exosomal es un sello distintivo de los diversos tipos de células tumorales, lo que refleja el estado de las células parentales. El mecanismo de incorporación del miRNA a los exosomas aún no es del todo clara (75). Se ha descrito que los miRNA pueden clasificarse en exosomas por cuatro vías posibles:

1) Vía dependiente de la esfingomielinasa neutra 2: la sobreexpresión de nSMase2 aumenta el número de miRNAs incorporados en los exosomas, mientras que su inhibición reduce el número de miRNAs exosómicos. Lo que contribuye a la metástasis de células cancerosas a través de la inducción de angiogénesis en el microambiente tumoral (76).

2) Los motivos de miRNA y la vía dependiente de ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas sumoiladas (hnRNP): hnRNPA2B1 reconoce el motivo GGAG en la región 3' UTR del miRNA, determinando su empaquetamiento en exosomas (77).

3) Vía dependiente de la secuencia del extremo 3' del miRNA: los extremos 3' adenilados de los miRNAs están enriquecidos en las células, mientras que los extremos 3' uridilados de los miRNAs endógenos se presentan principalmente en exosomas derivados de células B o de la orina (78).

4) Vía relacionada con miRISC: la desactivación de la proteína Ago2 podría disminuir los tipos y la abundancia de miRNA exportados en exosomas aislados de células HEK293T (79).

2.6 miRNAs de exosomas en cáncer pediátrico

Desde 2010 en México, el cáncer es la segunda causa de mortalidad entre los niños de 4 a 15 años, su tasa de incidencia en los últimos años ha estado en aumento, esto representa un problema de salud nacional actual, por lo cual resulta necesario ampliar, fortalecer y mejorar tanto el tratamiento como su diagnóstico (80). Los tipos

de cáncer pediátrico más frecuentes en la población mexicana son: Leucemia (49.8%), Linfomas (9.9%), Tumores del sistema nervioso central (9.4%), Tumores de células germinales (5.0%), Sarcomas de tejidos blandos (4.4%), Osteosarcoma (3.9%), Tumor de Ewing y sarcomas óseos relacionados (1.3%) (81). Como el diagnóstico de cáncer aún depende de la aparición de los síntomas, que pueden manifestarse en etapas avanzadas, existe la necesidad de descubrir nuevos biomarcadores como los miRNAs exosomales de saliva, para desarrollar métodos menos invasivos y más baratos para diagnosticar cánceres presintomáticos.

En cáncer pediátrico se han identificado varios miRNAs exosomales pero solo en suero, plasma y algunas líneas celulares (Tabla 1). El análisis de miRNAs exosómicos en suero de pacientes con osteosarcoma y con respuesta deficiente a la quimioterapia identificó a miR-124, miR-133a, miR-199a-3p y miR-385 subexpresados, mientras que miR-135b, miR-148a, miR-27a y miR-9 sobreexpresados (82). En leucemia aguda linfoblástica se demostró que miRNA-181b-5p transportado por exosomas en sangre periférica puede ingresar a las células y así promover la malignidad de las células de LAL (83). En rhabdomiosarcoma el miR-1246 y miR-1268, son responsables de efectos en las vías implicadas en la tumorigénesis, angiogénesis y apoptosis (84). El miR-675 exosómico del osteosarcoma metastásico promueve la migración e invasión celular al dirigirse a CALN1 (85). En sarcoma de Ewing, tanto CD99 como EWS-FLI1 coinciden en la oncogénesis y la inhibición de la diferenciación, en un ensayo donde CD99 estaba silenciado se demostró que el nivel de miR-34a es más alto y que este miRNA puede reducir Notch 1 y NF-κB, dando como resultado el aumento de la diferenciación neuronal de las células en sarcoma de Ewing (86).

Tabla 1. miRNAs contenidos en exosomas de tumores pediátricos.

Tumor	Muestra	Análisis RNA	Subexpresado	Sobreexpresado	Autor
OS Osteosarcoma	Plasma MG63, MG63.2	Secuenciación y RT-PCR	-	miR-675 miR-34b	Gong L. (85)
	HOS Suero	Microarreglos	miR-124 miR-133a miR-199a-3p miR-385	miR-135b miR-148a miR-27a miR-9	Xu JF. (82)
	SAOS-2 MG-63	Secuenciación	has-let-7b-5p has-miR-7d-5p has-miR-7e-5p	has-let-7f-5p has-miR-16-5p has-miR-21-5p	Raimondi L. (87)

	U-2 OS		has-miR-23a-5p has-miR-214-3p has-miR-125a-5p has-miR-331-3p has-miR-193b-3p has-miR-941 has-miR-1908-5p	has-miR-192-5p has-miR-148a-3p has-miR-182-5p has-miR-128-3p has-miR-126-5p has-miR-186-5p has-miR-301a-3p has-miR-151a-3p	
RMS Rabdomiosarcoma	RH30 RH41 RD JR1 RH36	Microarreglos	-	miR-1246 miR-1268	Ghayad S. (84)
RB Retinoblastoma	WERI-Rb-1 NCC-RbC-51	Secuenciación	-	hsa-miR-301b-3p hsa-miR-216b-5p	Ravishankar H. (88)
ALL Leucemia aguda linfoblástica	Sangre periférica BALL-1	RT-PCR	-	miRNA-181b-5p	Wein Y. (83)
	JM1 SUP-B15	q-PCR	-	miRNA-181a-5p	Haque S. (89)
AML Leucemia aguda mieloide	HL-60 Molm-14	RT-PCR	-	miR-4532	Chen Z. (90)
	Suero Molm-14	Microarreglos	-	miR-150 miR-155 miR-1246	Hornick N. (91)
Neuroblastoma	SK-N- BE(2)C Células Kelly	RT-PCR	-	miR-92a-3p miR-23a-3p miR-218-5p miR-320 miR-24-3p miR-27b-3p miR-16-5p miR-25-3p miR-21-5p	Haug BH. (92)
	Plasma	Secuenciación RT-PCR	-	miR-199a-3p	Ma J. (93)
EWS Sarcoma de Ewing	Células EWS	RT-PCR	-	miR-34a	Ventura (86)
	CD99 neg	Microarreglos	-	miR-199a-3p	De Feo A. (94)
Tumores cerebrales	GSCS	Microarreglos	-	miR-1290 miR-1246	Túzesi Á. (95)

2.7 miRNAs de exosomas salivales en cáncer como biomarcadores

En la actualidad los estudios de exosómica de la saliva son pocos, pero representan avances significativos, ya que los exosomas y sus componentes como los miRNAs podrían usarse como biomarcadores de diagnóstico y también para comprender los mecanismos moleculares de los diferentes tipos de cáncer. Además, puede permitir establecer tecnologías rápidas y sensibles para una oportuna detección.

En un estudio de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), Langevin y col. identificaron un conjunto de miRNAs exosomales (miR-486-5p, miR-486-3p y miR-10b-5p) por medio de secuenciación, cuyos niveles estaban más altos en saliva de pacientes con HNSCC en relación con los controles sin cáncer, lo que destaca la utilidad clínica potencial de los miRNAs exosómicos como biomarcadores salivales (96).

Respecto del cáncer del tracto pancreatobiliar, anteriormente se había demostrado que los niveles de expresión de miR-1246, miR-3976, miR-4306 y miR-4644 en exosomas séricos eran más altos en pacientes con cáncer de páncreas que en los controles sanos, por lo tanto Machida y col. evaluaron los miRNAs exosomales de saliva no estimulada en doce pacientes con cáncer del tracto pancreatobiliar y trece pacientes control sanos usando PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), concluyendo que las proporciones de expresión relativas de miR-1246 y miR-4644 fueron significativamente más altas en el grupo de cáncer que en el grupo de control por lo que podrían ser biomarcadores candidatos para este tipo de cáncer (97).

Lihong He y col. realizaron un análisis de miRNAs expresados diferencialmente a partir de exosomas salivales de cuatro controles sanos y cuatro pacientes con carcinoma de células escamosas orales (OSCC) mediante microarreglos, se concluyó que el miR-24-3p exosomal es un nuevo biomarcador de diagnóstico potencial para OSCC y que dicho miRNA puede mantener la proliferación de células OSCC a través de la orientación de PER1 (98).

Aunque no se han reportado estudios de miRNAs exosomales en saliva en población pediátrica, es de suma importancia identificar el perfil de miRNAs contenido en exosomas salivales, ya que serían una herramienta muy útil en el diagnóstico, pronóstico y evaluación a la respuesta de tratamientos.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversos autores han identificado diferentes biomarcadores en saliva para trastornos que van desde el cáncer hasta enfermedades infecciosas (12-15). Sin embargo, hasta el momento no hay estudios sobre microRNAs de exosomas salivales en cáncer pediátrico, por lo que se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Qué parámetros se pueden establecer para evaluar la identificación por medio de secuenciación masiva paralela de miRNAs de exosomas salivales en pacientes con cáncer pediátrico?.

4 JUSTIFICACIÓN

Estudios clínicos han identificado exosomas en fluidos como plasma, orina, líquido cerebroespinal, líquido amniótico, lavado bronquial, líquido sinovial, leche materna y saliva (20-24). El empleo de saliva nos permite de una forma relativamente fácil y no invasiva, obtener muestras de pacientes con la finalidad de aislar los exosomas y estudiar el contenido de éstos. Los exosomas pueden transportar diversas moléculas, incluyendo ARNm, miRNAs y proteínas; su contenido depende de la célula de origen. Los exosomas derivados de tumores contienen características moleculares de los tumores en una concentración enriquecida. En particular, se han identificado perfiles de miRNAs asociados con diferentes tipos de cáncer (7, 17, 99). En consecuencia, la detección de miRNAs en exosomas podrían ser utilizados para detección temprana, diagnóstico, evaluación de riesgo y para determinar la prognosis de un tumor.

5 OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar la identificación por medio de secuenciación masiva paralela de miRNAs de exosomas salivales en pacientes con cáncer pediátrico.

Objetivos específicos:

1. Estandarizar la metodología para el aislamiento de miRNAs derivados de exosomas salivales.
2. Evaluar las condiciones para la preparación de librerías para secuenciación masiva paralela de miRNAs derivados de exosomas salivales.
3. Establecer el flujo de análisis de datos de secuenciación de miRNAs derivados de exosomas salivales.

6 HIPÓTESIS

Sí la saliva de pacientes pediátricos con y sin cáncer contiene exosomas, entonces con la estandarización de metodologías es posible obtener miRNAs de exosomas salivales con concentración y calidad suficiente para ser analizados por secuenciación masiva paralela.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en dos fases, la primer fase piloto se realizó para establecer las condiciones para el estudio de miRNAs derivados de exosomas salivales en pacientes pediátricos. En la segunda fase del estudio se realizó la secuenciación de miRNAs de exosomas salivales en un grupo de casos de pacientes pediátricos con cáncer y en un grupo de controles pareados por edad y sexo.

7.1 FASE 1

7.1.1 Descripción del estudio:

Estudio de reporte preliminar: Estudio observacional, analítico, transversal, prospectivo.

7.1.2 Colección y procesamiento de saliva

El protocolo de toma y procesamiento de saliva ya estaba establecido en el laboratorio de Genómica Clínica y se describe a continuación:

Previo a cada toma de muestra de saliva se solicitó el consentimiento informado de padres o tutores y el asentimiento informado en pacientes mayores de 12 años. De igual forma, se solicitó información de datos personales, antecedentes patológicos y no patológicos, antecedentes hereditarios, padecimiento actual y exploración bucal del donador durante la recolección. La colección de saliva total no estimulada por acumulación pasiva se realizó en un horario de 8:30 a 11:00 hrs., solicitando previamente a los participantes evitar comer y cepillar los dientes una hora antes de la toma de muestra. Al momento de la toma se solicitó a los donadores realizar un enjuague vigoroso con agua, evitar movimientos orofaciales y comenzar la acumulación de saliva para depositarla en un tubo falcón hasta obtener un volumen total de 5 mL de saliva sin exceder los 30 minutos. El procesamiento de la saliva total se lleva a cabo por centrifugación 2600 x g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido se depositó en crioviales previamente etiquetados, se almacenaron en el ultracongelador a -80 °C y los datos de historia clínica se almacenaron en la base de datos correspondiente al proyecto.

7.1.3 Aislamiento de exosomas salivales

Tang y col. probaron y compararon diferentes métodos de aislamiento de exosomas, Total Exosome Isolation y Exo-Quick mostraron una mayor eficiencia de recuperación exosomal comparado con la ultracentrifugación (100). Por lo tanto, para el aislamiento de exosomas se seleccionó el kit "Total Exosome Isolation from other body fluids", Invitrogen (cat. 4484453). Se descongelaron 500 µL de cada muestra de saliva procesada en baño María a 36 °C durante 5 minutos, se adicionó 250 µL del reactivo y se incubó durante 1h a 4 °C. Posteriormente se centrifugaron

a 12000 x g durante 1 h a 4 °C, el sobrenadante se descartó y se centrifugó una vez más a 12000 x g durante 5 minutos, el pellet obtenido se resuspendió en 30 µL de PBS 1x.

7.1.4 Caracterización de exosomas salivales

Para la estandarización del protocolo de caracterización de exosomas se emplearon muestras de exosomas salivales tanto de casos como de controles de pacientes pediátricos y cultivo de células Hela como control positivo. Para identificar si las vesículas aisladas corresponden a exosomas salivales, se consideraron los criterios mínimos de MISEV para estudio de vesículas extracelulares, Kenneth W, Clotilde T y col. (35) refieren la identificación de al menos 3 marcadores proteicos mediante Western blot (WB), incluidas proteínas transmembranales y citosólicas, por ejemplo: CD63, CD9, CD81, HSP70 y GAPDH. Y para conocer la morfología y tamaño se utilizó microscopía electrónica de transmisión.

7.1.4.1 Western Blot

a) Lisado de muestras

Para la lisis celular de Hela (confluencia 80%), primero se descartó el medio de cultivo, después se lavó 2 veces con 1 mL de PBS frío, con un scrapper se desprendieron las células y el mL de PBS con células desprendidas se centrifugó por 1 minuto a 10000 rpm, posteriormente se descartó el sobrenadante y se adicionó 400µL de buffer RIPA (cat. R0278) con inhibidor de proteasas Complete Mini (101), se incubó en hielo durante 10 minutos, por último se centrifugó a 15 minutos a 10000 rpm y se conservó el sobrenadante en un tubo nuevo. Otra forma en que se lisaron las células Hela fue con sonicación durante 30 segundos a 30 pulsos, después de los lavados con PBS .

Para la lisis de exosomas, después de su aislamiento se colocaron 30µL de buffer RIPA con inhibidor de proteasas.

b) SDS-PAGE

La cuantificación de proteínas de las diferentes muestras se llevó a cabo por el método Bradford. Las condiciones para la electroforesis SDS-PAGE fueron 125 V por 70 minutos, empleando geles de poliacrilamida al 10% y 12%. La concentración

de proteína adicionada en cada pozo fue de 20 a 25 μg , las muestras se desnaturalizaron a 70°C durante 5 minutos. El patrón de proteínas se visualizó con Azul de Coomasie.

c) Transferencia

Las condiciones para la transferencia fueron 170 mA por 60 min, empleando una membrana PVDF (Amersham), el patrón de proteínas transferidas se visualizó con rojo de Ponceau (cat. P7170). La membrana se bloqueó durante 1 h a temperatura ambiente con leche al 5% en buffer TBS, posteriormente se lavó con buffer de lavado TBS-Tween 0.05% y se incubó toda la noche a 4 °C el anticuerpo primario, los marcadores empleados fueron HSP70 (cat. EXOAB-HSP70A-1), CD9 (cat. EXOAB-CD9A-1), CD81 (cat. EXOAB-CD81A-1), CD63 (cat. EXOAB-CD63A-1 y GAPDH (cat. 0411) en una dilución 1:10000. Se lavó con buffer de lavado y se incubó anticuerpo secundario (anti-conejo y anti-ratón) durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas se revelaron con películas fotosensibles, se usó reactivo de quimiluminiscencia (cat. RPN2236), se expusieron de 5 a 10 minutos, se revelaron, lavaron y fijaron.

7.1.4.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

En colaboración con el laboratorio de Microscopía electrónica de la Facultad de Ciencias, se realizó el ensayo de MET. Para el ensayo de MET se inició con el aislamiento de exosomas a partir de un volumen de 500 μL de sobrenadante de saliva con el kit "Total exosome isolation from others fluids", los exosomas fueron resuspendidos en 30 μL de buffer PBS 1x, la solución se colocó en una malla de cobre y se procedió a realizar tinción negativa con acetato de uranilo al 2% durante 10 minutos, posteriormente la muestra se secó durante 2 minutos, la malla de cobre se observó con el equipo Jeol 1010.

Otro ensayo realizado fue con muestras de exosomas resuspendidos en 30 μL de buffer PBS 1x fijados con glutal/paraformaldehído 2.5/4%, deshidratados con etanol en diferentes porcentajes, se añadió tetróxido de osmio al 1% al sedimento durante 120 minutos y las muestras se lavaron luego con tampón de cacodilato. Después de la deshidratación, los gránulos se fijaron con resina epoxi y se cortaron en

secciones ultrafinas que se colocaron en rejillas de níquel y se tiñeron adicionalmente con acetato de uranilo y citrato de plomo, 15 minutos cada uno. Finalmente, las secciones se examinaron usando el equipo Jeol 1010.

7.1.5 Extracción de ARN de exosomas salivales

Para la estandarización del protocolo de extracción de ARN de los exosomas, primero se realizó un ensayo para elegir un kit de extracción, para lo cual se utilizó el sobrenadante de saliva de 2 donantes de misma edad y sexo, se hicieron tres alícuotas de 200 µL por donador para cada kit. Se compararon los diferentes kits de extracción de ARN: Trizol (cat. 15596018), Pure link miRNA isolation (cat. K157001), miRNeasy (cat. 217084) y miRVANA (cat. AM1560), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la cuantificación de las muestras se empleó Nanodrop 2000.

A partir de la elección de kits, se hizo un ensayo de extracción de miRNAs con tres casos de ALL pareados por edad y sexo con su respectivo control, el kit empleado fue miRNeasy (cat. 217084), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la cuantificación de las muestras se empleó el kit Qubit dsDNA HS Assay (cat. Q33231).

7.1.6 Elaboración de bibliotecas de miRNAs de exosomas salivales

Cloelia Dard y col. en un estudio compararon cinco kits para preparación de bibliotecas y reportaron que NEXTflex detectó un mayor número de miRNAs diferentes (102), por tal motivo se seleccionó dicho kit. En colaboración con el Laboratorio Nacional de Apoyo Tecnológico a las Ciencias Genómicas, LNATCG del Instituto de Biotecnología, UNAM, se realizó la capacitación para la elaboración de bibliotecas de una prueba piloto de 4 muestras correspondiente a un caso de ALL con su respectivo control y un caso de cáncer de pulmón con su respectivo control. El RNA de las muestras se aisló con el kit miRNeasy (cat. 217084) y se cuantificó con el kit Qubit dsDNA HS Assay (cat. Q33231).

Se utilizó el kit NEXTflex Small RNA-Seq Kit v3 y se siguieron las indicaciones del fabricante. El procedimiento consiste en 6 etapas: a) ligación de adaptadores adenilados 3', b) remoción del exceso de adaptadores 3', c) inactivación del exceso de adaptadores, d) ligación adaptadores adenilados 5', e) Transcripción Reversa, d)

Limpieza con perlas magnéticas, e) Amplificación por PCR y f) selección de tamaño por gel de poliacrilamida al 6%. Al realizar todo el procedimiento con la ligación de los adaptadores en ambos extremos de la secuencia del ARN, así como la ligación de los barcode, el tamaño esperado de la banda es aproximadamente 145 pb, esto se obtuvo al sumar las siguientes secuencias más los 25 nt del tamaño correspondiente a los miRNAs. En el gel de acrilamida al 6% se cortó aquella banda que se encontraba entre 150 y 200 pb. Para la cuantificación de la muestra se empleó el kit Qubit dsDNA BR Assay (cat. Q32853).

7.1.7 Secuenciación de miRNAs de exosomas salivales

En colaboración con la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática, UUSMB y del Laboratorio Nacional de Apoyo Tecnológico a las Ciencias Genómicas, LNATCG del Instituto de Biotecnología, UNAM, se realizó la secuenciación del RNA en la plataforma Illumina NextSeq 500 con una duración de 150 ciclos, el kit empleado fue NextSeq 500/550 v2, se siguieron las indicaciones del fabricante. Las muestras de cDNA se llevaron a una concentración de 4 nM y posteriormente a 1.8 nM para el pool de secuenciación. Los archivos de secuenciación sin procesar de Illumina NextSeq se convirtieron al formato fastq mediante bcl2fastq (versión 2.20.0).

7.1.8 Análisis Bioinformático

Como solo se cuenta hasta el momento con un caso de ALL y su respectivo control secuenciados, se realizó la estandarización del protocolo del análisis bioinformático abarcando control de calidad, recorte, alineamiento, conteo e identificación de miRNAs (ver Anexo 2).

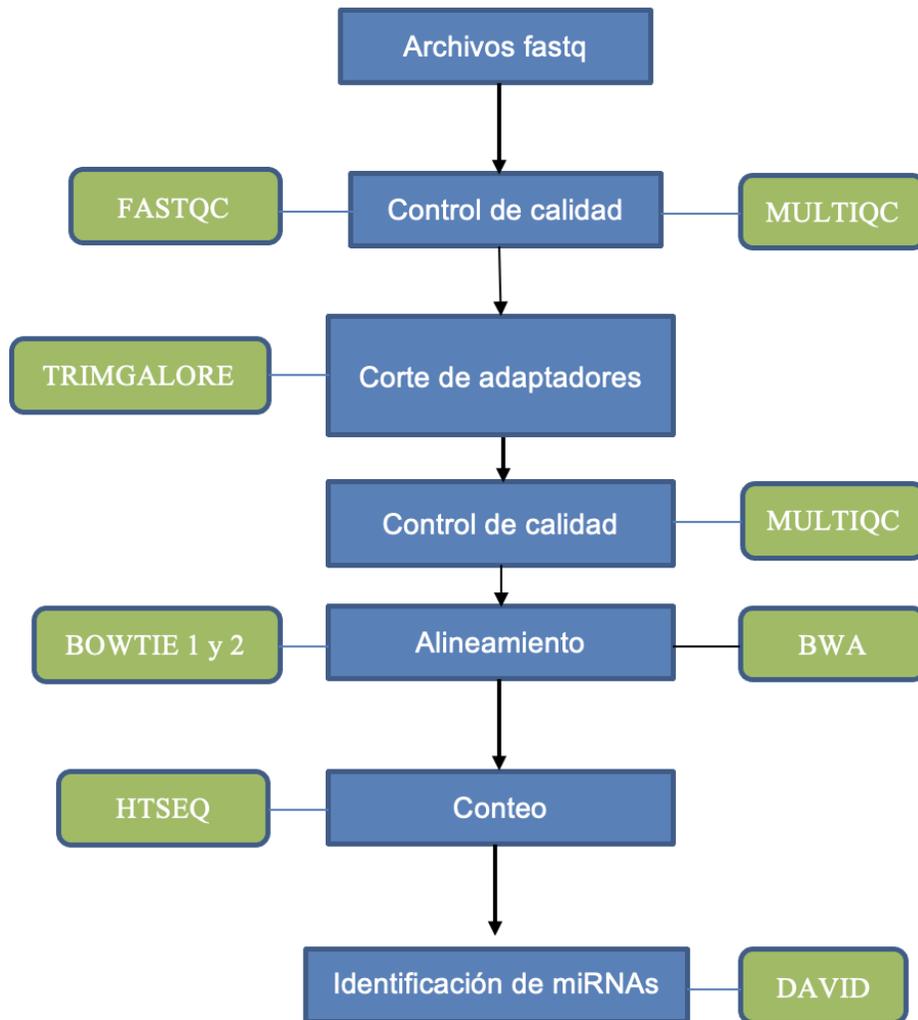


Figura 3. Flujo de trabajo del análisis bioinformático.

En color verde se muestran los programas utilizados en cada paso del procedimiento.

7.2 FASE 2

7.2.1 Descripción del estudio:

Estudio de identificación de biomarcadores: estudio observacional, analítico, transversal, prospectivo (103, 104).

7.2.2 Variables

- a) Independiente: tipo de cáncer
- b) Dependientes: perfil de miRNAs.
- c) Covariables: sociodemográficas, clínicas, oncológicas.

7.2.3 Descripción de la población

Pacientes pediátricos con sospecha de cáncer, entre 3 y 17 años. Los pacientes fueron estadificados de acuerdo con los criterios del servicio de Oncología de las instituciones participantes. Los tipos de cáncer incluidos fueron los de mayor frecuencia en la población. Las muestras salivales se obtuvieron durante los años 2016 al 2020 en las siguientes instituciones: para casos en el Instituto Nacional de Pediatría (INP) y Centro Médico Nacional 20 de noviembre ISSSTE. Para los controles sin cáncer se incluyeron niños y adolescentes que asistieron a la Clínica de Odontopediatría y Clínica de Admisión de la Facultad de Odontología de la UNAM, así como escuelas participantes. Los controles fueron pareados por edad y sexo con los casos.

7.2.4 Tamaño de la muestra

Se utilizó una muestra por conveniencia, se emplearon de 10 a 5 muestras de saliva por cada tipo de cáncer pediátrico (tabla 2).

Tipo de muestra	Selección	
	N	n
Leucemia Aguda Linfoblástica	32	10
Linfoma de Hodgkin	11	8
Linfoma No Hodgkin	15	8
Rabdiomiosarcoma	12	5
Sarcoma de Ewing	11	7
Osteosarcoma	17	9
Total	98	47

Tabla 2. Tipos de cáncer pediátrico seleccionados.

N, corresponde al número de casos totales. Mientras que n, corresponde al número de casos seleccionados para el ensayo.

7.2.5 Criterios de selección para casos y controles

Para la selección de casos y controles se tomaron en cuenta los siguientes criterios de inclusión, exclusión y eliminación (tabla 3).

Tabla 3. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación para donantes de saliva.

Criterios	Inclusión	Exclusión	Eliminación
Casos	Edad: 3-17 años. Cualquier sexo. Sospecha de diagnóstico de cáncer. Sin tratamiento previo. Consentimiento informado firmado por padre o tutor.	Diagnóstico de cáncer previo. Terapia inmunosupresora previa. Infección por HIV o Hepatitis. Enfermedades de glándulas salivales. Radioterapia en cabeza y cuello. Síndrome de Sjögren's. Uso de medicamentos que afectan el flujo de saliva.	No se confirma por patología diagnóstica . Muestra de saliva insuficiente. RNA con concentración o calidad insuficiente. Alta voluntaria o traslado a otra Institución para su tratamiento y seguimiento. Falta o imprecisión de la información recabada en el interrogatorio inicial. Deseo de no continuar en el estudio.
Controles	Edad: 3-17 años. Cualquier sexo. Sin evidencia de cáncer. Consentimiento informado firmado por padre o tutor.	Diagnóstico de cáncer previo. Terapia inmunosupresora previa. Infección por HIV o Hepatitis. Enfermedades de glándulas salivales. Radioterapia en cabeza y cuello. Síndrome de Sjögren's. Uso de medicamentos que afectan el flujo de saliva.	Muestra de saliva insuficiente. RNA con concentración o calidad insuficiente. Falta o imprecisión de la información recabada en el interrogatorio inicial. Deseo de no continuar en el estudio.

7.2.6 Consideraciones éticas

El estudio se realizó sin afectar el proceso terapéutico de los pacientes y siguiendo los lineamientos descritos en la declaración de Helsinki sobre investigación en seres humanos. El proyecto fue aprobado por los comités de ética e investigación del Instituto Nacional de Pediatría con número de registro 2015/056 y el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre ISSSTE con número de registro 357.2017. El financiamiento del proyecto se realizó a través del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social de CONACYT, con el número 261884 y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación tecnológica PAPIIT de la UNAM con número IA208216.

7.2.7 Extracción de microRNAs de los casos y controles

Para las muestras seleccionadas de casos y controles se utilizó el kit “miRVANA miRNA Isolation kit de invitrogen” (cat. AM1560). El pellet de exosomas se obtuvo con el kit “Total Exosome Isolation from other body fluids”, el cual se resuspendió en 30 μ L de PBS 1x y se añadió 300 μ L de buffer de lisis junto con 50 μ L de aditivo homogenizador, se mezcló homogéneamente y se incubó por 10 minutos a 4°C, posteriormente en la fase de extracción orgánica se adicionó 500 μ L de Ácido Fenol Cloroformo, se mezcló y centrifugó a 10000 x g durante 5 minutos. Se obtuvo la fase acuosa y se precipitó el RNA total con la adición de 625 μ L de etanol al 100%, se colocó en un tubo colector con filtro y se llevaron a cabo 3 lavados con su respectiva solución de lavado, se centrifugó a 10000 x g durante 15 segundos. Finalmente el RNA recolectado en el filtro se diluyó con 50 μ L de agua libre de RNAsas, se transfirió a un criovial y se almacenó a -80 °C. Para la cuantificación de las muestras se empleó el kit microRNA Qubit (cat. Q32880) y también se cuantificó en nanodrop 2000.

7.2.8 Elaboración de bibliotecas y secuenciación de los casos y controles

Se utilizó el kit NEXTFLEX Small RNA-Seq Kit v3 y se siguieron las indicaciones del fabricante. Para la cuantificación de la muestra se empleó el kit Qubit dsDNA BR Assay (cat. Q32853) y para conocer la integridad de la biblioteca se analizó por TapeStation de Agilent Technologies con el kit High Sensitivity D1000 Screen Tape System (cat. 5067-5585). En colaboración con la Unidad de Secuenciación del INMEGEN, se realizará la secuenciación del RNA en la plataforma Illumina NextSeq 500 con una duración de 150 ciclos. Las muestras de cDNA se llevaron a una concentración de 4 nM y posteriormente a 1.8 nM para el pool de secuenciación, las muestras fueron separadas en 2 pool, uno con 40 muestras y otro con 39 muestras, para que no coincidieran los barcodes.

8 RESULTADOS

FASE 1

Se aislaron exosomas salivales y se estandarizó protocolo SDS-PAGE al 12%.

Los exosomas se aislaron a partir de un volumen de 500 μL de sobrenadante de saliva (figura 4, A), el pellet exosómico era de color blanco y fue resuspendido para su lisado en buffer RIPA con inhibidor de proteasas. Para el lisado de células HeLa se desacartó el método de lisis celular por sonicación debido a que no se generó un patrón de bandas de proteínas amplio (figura 4, B). Las concentraciones obtenidas de proteínas exosomales fueron de un rango de 2.42 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a 3.75 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, se utilizó para el gel 1 una concentración de 20 μg y para el gel 2, 25 μg de proteína total de cada una de la muestras. Con lo observado en ambos geles se consideró la concentración de 25 μg de proteína de cada muestra para la carga en geles SDS-PAGE al 12%, a 125 V por 70 min.

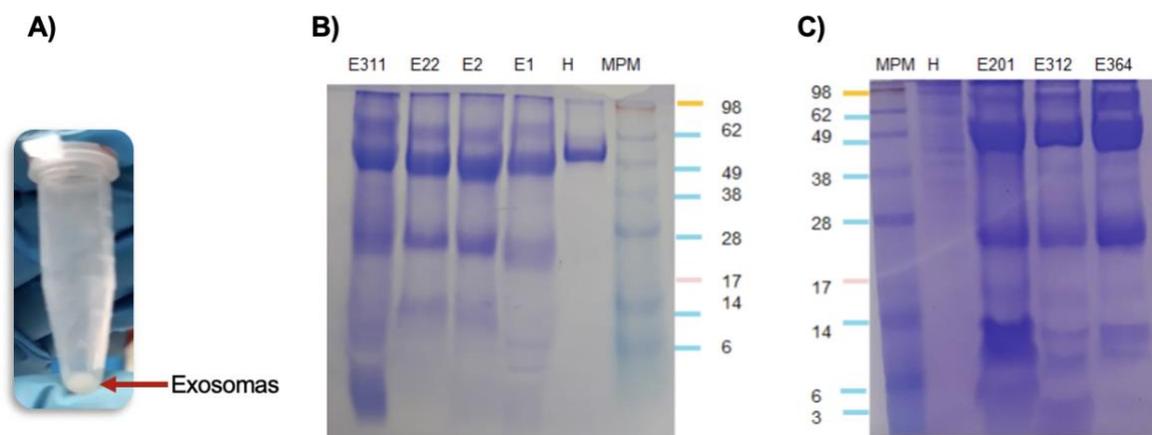


Figura 4. Exosomas y geles de poliacrilamida.

A) Aislamiento de exosomas, se observa pellet blanco correspondiente a los exosomas aislados. B) SDS-PAGE al 10% y C) SDS-PAGE al 12%, teñidos con Azul de Coomasie, se puede observar el patrón de bandas correspondiente a células HeLa (H), proteínas derivadas de exosomas salivales (E) y marcador de peso molecula (MPM).

Se caracterizaron los exosomas salivales mediante Western blot y MET.

Para confirmar que las estructuras estudiadas eran específicas de exosomas, se emplearon los marcadores CD63, CD9, CD81 (proteínas transmembranales), Hsp70 y GAPDH (proteínas citosólicas), ya que estas moléculas son marcadores

comúnmente utilizados para exosomas salivales (24). El análisis de transferencia Western blot de exosomas de saliva confirmó la presencia de dichas proteínas, la carga de 25 µg de proteína total por pozo fue la adecuada para mostrar la expresión de los marcadores exosomáticos. En un primer ensayo se identificó a Hsp70 en exosomas salivales (figura 5, A), las bandas se presentaron alrededor de 62-70 kDa. En el segundo ensayo se identificaron los marcadores CD63, todas las muestras presentaron una banda alrededor de 50-55 kDa, con CD9 solo se observó una en la muestra E178 y CD81 se presentó en todas la muestras, las bandas se encontraban entre 26 y 28 kDa. (figura 5, B).

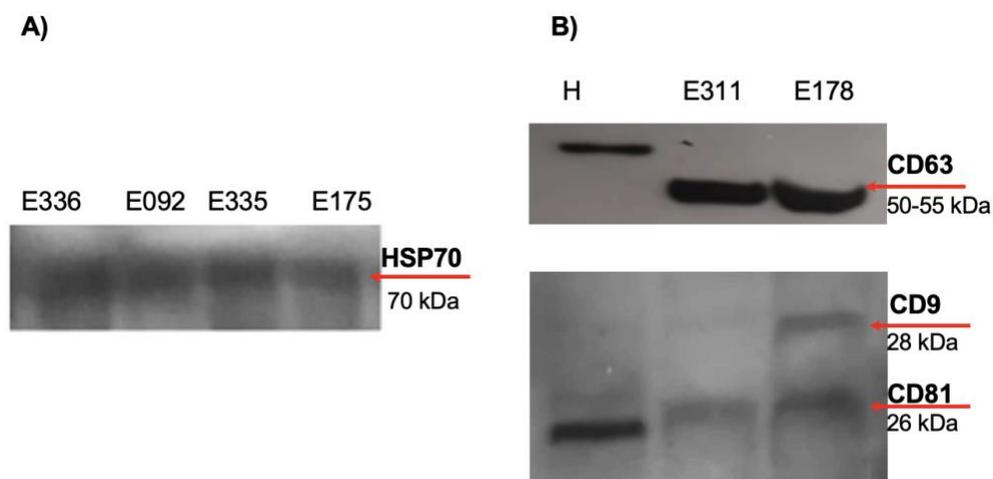


Figura 5. Detección de proteínas exosómicas HSP70, CD63, CD9 y CD81.

A) Proteína citosólica HSP70, las muestras E336 y E335 corresponde a casos de ALL, E092 y E175 a sus respectivos controles. B) Proteínas transmembranales CD63, CD9 y CD81, la muestra E311 es un caso de ALL y E178 su control. H son células HeLa.

En el tercer ensayo se identificaron a CD63, que estaba entre las bandas de 49 y 62 kDa en todas las muestras, GADPH como control positivo, que estaba presente en todas las muestras por debajo de la banda de 38 kDa, pero sus bandas eran menos intensas comparadas con los otros marcadores (figura 6) y CD9 se presentó en bandas de 28 kDa en solo dos muestras, E201 y E364.

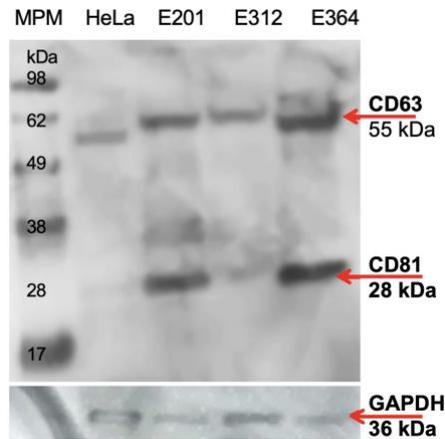


Figura 6. Detección de proteínas exosómicas CD63, CD9 y GAPDH.

Se identificaron la proteínas transmembranales CD63, CD9 y la proteína citosólica GAPDH como control positivo, las muestras E312 corresponde a caso de ALL y E201 a su control. E364 corresponde a un caso de LH.

Los exosomas obtenidos se examinaron mediante MET, las micrografías electrónicas revelaron que los exosomas de saliva eran vesículas redondeadas de aproximadamente de 30-110 nm con membranas de bicapa lipídica, se localizaron de forma individual o en agregados (figura 7, 8 y 9) y son similares a los exosomas liberados en otros fluidos corporales (20-23).

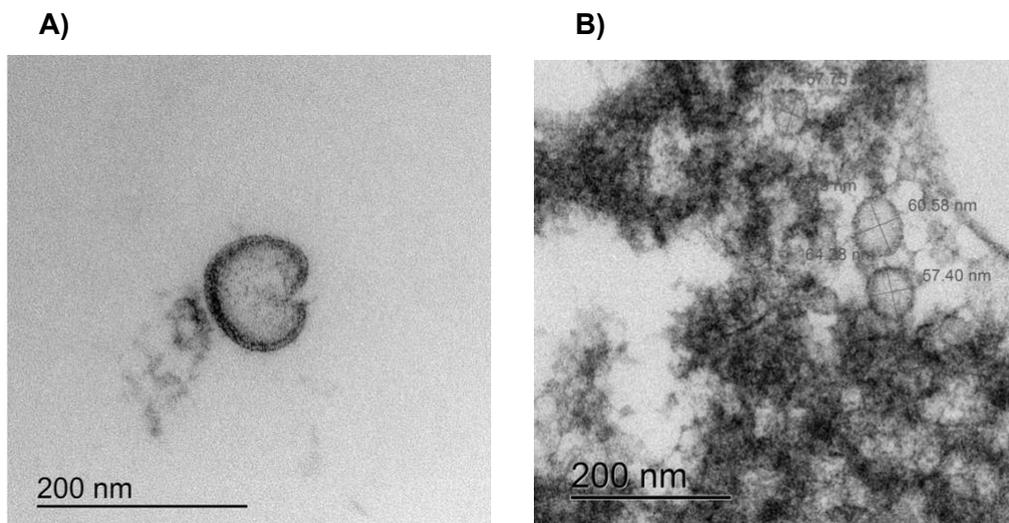


Figura 7. TEM de exosomas salivales.

Los exosomas corresponden a una muestra control. A) Exosoma localizado de forma individual con un diámetro de 86.81 nm de ancho y 107.66 nm de largo. B) Exosomas en agregados con tamaño de 57-64 nm aproximadamente. Las muestras de exosomas fueron fijadas con

glutaraldehído /paraformaldehído 2.5/4%, se contrastaron adicionalmente con acetato de uranilo y citrato de plomo, se examinaron usando el equipo Jeol 1010. Las manchas negras que se observan eran proteínas. Escala de barra=200 nm.

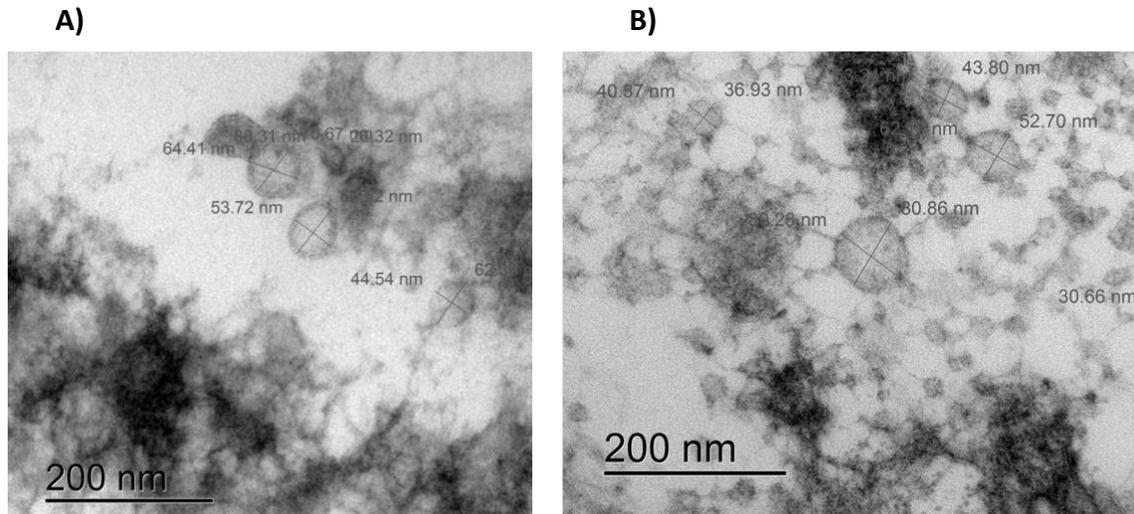


Figura 8. TEM de exosomas salivales aislados de un paciente con LAL.

A) En la micrografía podemos observar la morfología redonda de los exosomas con un tamaño de 40-88 nm aproximadamente. B) La micrografía presenta mayor cantidad de exosoma con un tamaño de 30-80 nm. Escala de barra=200 nm.

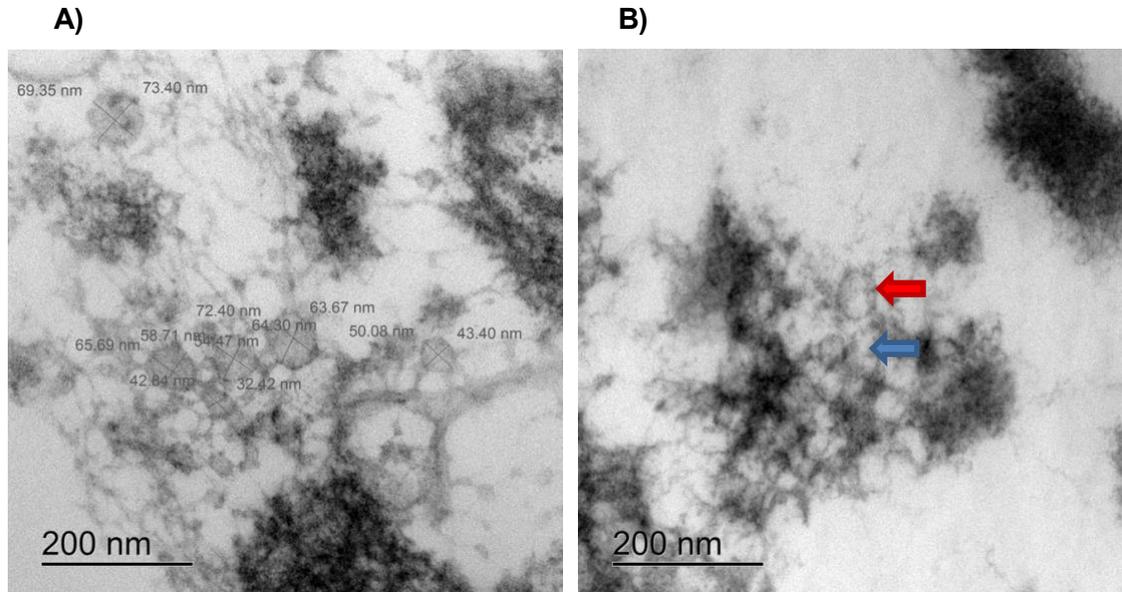


Figura 9. TEM de exosomas salivales aislados de un paciente con LNH.

A) En la micrografía podemos observar exosomas agregados con un tamaño de 32-72 nm aproximadamente. B) La micrografía presenta tanto exosomas integros (flecha roja) como exosomas rotos(flecha azul). Escala de barra=200 nm.

Con respecto a los exosomas que se contrastaron solo con acetato de uranilo al 2%, se visualizaron las estructuras de los exosomas, pero por problemas con el equipo no se calculó el tamaño exacto de los exosomas (figura 10).

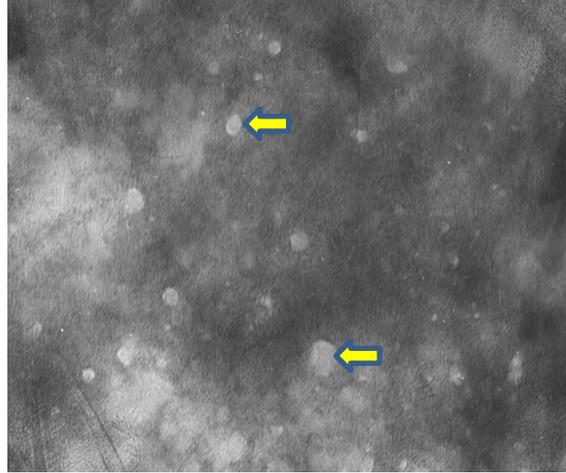


Figura 10. TEM de exosomas de un paciente con LAL empleando tinción negativa.

Se utilizó acetato de uranilo al 2%, en la micrografía se observan las estructuras esféricas de los exosomas (flecha amarilla). Con este contraste no podemos observar la membrana lipídica de las vesículas.

Se realizó una comparación de cuatro kits comerciales diferentes para la extracción de microRNAs de exosomas salivales

Para la estandarización del protocolo de extracción de microRNAs de los exosomas, se compararon diferentes kits de extracción de miRNAs, las muestras se cuantificaron en nanodrop2000, las concentraciones promedio de ARN obtenidas fueron: Trizol 251.86 ng/ μ L \pm 185.3, Pure link miRNA isolation 15.11 ng/ μ L \pm 3.36, miRNeasy 16.1 ng/ μ L \pm 8.35 y miRVANA 15.73 ng/ μ L \pm 1.83. También se consideró la relación A260/280 para conocer la pureza de ARN, la pureza evaluada por la relación promedio A260/280 fue para miRVANA 1.75 \pm 0.05 y 1.66 \pm 0.09 para miRNeasy. Sin embargo, para Trizol y Pure link miRNA isolation mostraron un promedio más bajo. Por lo tanto, dos opciones de kits para extracción de miRNAs exosomales que se consideraron fueron miRNeasy y miRVANA.

Para la prueba piloto se seleccionó el caso de ALL con concentración más alta, el cual corresponde al ID 336 con 0.504 ng/ μ L y su control ID 092 con 0.288 ng/ μ L,

las concentraciones de miRNAs de los tres casos de ALL y sus controles fueron las siguientes (tabla 4).

Muestra	ID	Edad	Sexo	Volumen total μL	[miRNA] $\text{ng}/\mu\text{L}$
ALL	329	9	M	30	Fuera de rango
Control	328	9	M	30	0.324
ALL	336	5	H	30	0.504
Control	092	5	H	30	0.288
ALL	175	11	H	30	0.492
Control	335	11	H	30	0.172

Tabla 4. Concentraciones de miRNAs.

Se realizó una prueba piloto que nos permitió establecer las condiciones para la elaboración de bibliotecas y secuenciación.

En la prueba piloto se procesaron 4 muestras, un caso de ALL (ID 336) y su control (092), al igual que un caso de cáncer de pulmón FCP (ID 69) y su control FSC (ID 102), se seleccionaron dichas muestras porque representaban las concentraciones más altas y las más bajas (tabla 5). Se elaboraron las bibliotecas de las muestras seleccionadas con el kit NEXTFLEX Small RNA-Seq Kit v3 y se realizó selección por PAGE para identificar la banda de 150-200 pb correspondiente al tamaño de pequeños RNAs presentes en las muestras (figura 1). Se cuantificaron las concentraciones de cDNA obtenidas, las cuales fueron de 6.99 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para ALL y 2.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para su control, el mínimo de concentración requerida para la secuenciación es de 1 ng total de cDNA. Las muestras FCP y FSC presentaron una baja concentración de cDNA y su control de calidad obtuvo una calidad inferior a 30, gracias a estos resultados se consideró tomar una concentración de miRNA $>0.18 \text{ ng}/\mu\text{L}$ para la elaboración de bibliotecas. Los archivos en formato fastq fueron utilizados para la estandarización del protocolo de análisis bioinformático.

Tabla 5. Concentraciones de miRNAs y cDNA.

Muestra	ID	Edad	Sexo	Volumen μL	[miRNA] $\text{ng}/\mu\text{L}$	Volumen μL	[cDNA] $\text{ng}/\mu\text{L}$
FCP	69	44	H	30	0.144	25	0.18
FSC	102	44	H	30	0.136	25	0.62
ALL	336	5	H	30	0.504	25	6.99
Control	092	5	H	30	0.288	25	2.92

*FCP: fumador con cáncer de pulmón, FSC: fumador sin cáncer. ALL: Leucemia linfoblástica aguda.

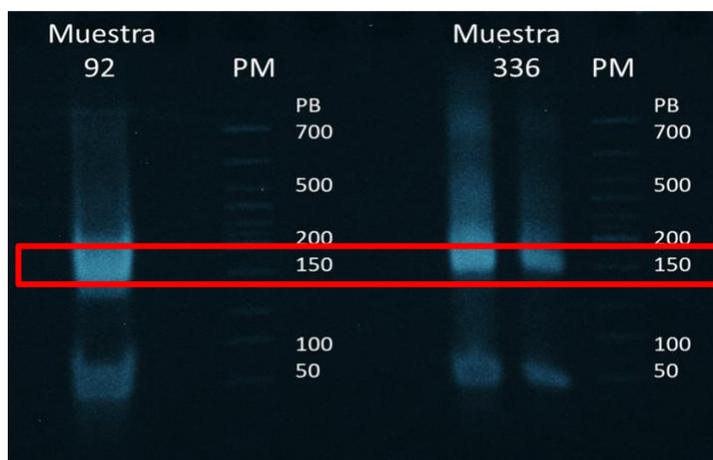


Figura 11. Gel de acrilamida al 6%, teñido con bromuro de etidio.

En recuadro rojo se identifica la banda de 145-150 pb correspondiente al tamaño de pequeños RNAs presentes en las muestras.

El control de calidad de las dos muestras del piloto de secuenciación obtuvieron una calidad superior a 30 en escala Phred.

Los archivos fastq de las lecturas sin procesar fueron analizados con FastQC y MultiQC para el primer análisis de calidad (tabla 6), donde se observó que el porcentaje de lecturas duplicadas corresponde al rango del 72.6-83.1%, el contenido de GC es del 53%, y las secuencias totales van de un rango de 6-7 millones, el valor de calidad promedio es superior a 30, lo que indica una buena calidad, ninguna muestra reportó bases ambiguas (N), es decir todas las bases fueron identificadas. Todas las muestras tuvieron una longitud de 75 pb y con menos del 1% de secuencias sobrerrepresentadas. Al recortar las secuencias con TrimGalore (específicamente con Cutadapt), se eliminaron las secuencias del adaptador 3' (5'-TGGAATTCTCGG-3') que se agregaron en la construcción de la biblioteca. El 51.8-56.6% de pb fueron recortadas, el porcentaje de lecturas duplicadas corresponde al rango del 73.7-86%, el contenido de GC es del 55-56%, y las secuencias totales están en un rango de 5.7-6.8 millones (tabla 7), el valor de calidad promedio se ubica por encima de 30, ninguna muestra reportó bases N. Las muestras tenían una longitud de 33-38 pb, presentaron menos del 1% de secuencias sobrerrepresentadas.

Tabla 6. Estadísticas generales del control de calidad de las muestras sin procesar.

Nombre de la muestra	% Lecturas duplicadas	%GC	Longitud	Secuencias totales (millones)
Small3_S13_R1_001 (caso ALL)	73.0%	53%	76 bp	7.0
Small3_S13_R2_001 (caso ALL)	72.6%	53%	76 bp	7.0
Small4_S14_R1_001 (control)	84.1%	53%	76 bp	6.0
Small4_S14_R2_001 (control)	83.7%	53%	76 bp	6.0

Tabla 7. Estadísticas generales del control de calidad de las muestras recortadas.

Nombre de la muestra	% de pb recortadas	% Lecturas duplicadas	% GC	Longitud	Secuencias totales (millones)
Small3_S13_R1_001 (caso ALL)	56.6%	75.2%	56%	33 bp	6.8
Small3_S13_R2_001 (caso ALL)	55.8%	73.7%	56%	34 bp	6.8
Small4_S14_R1_001 (control)	52.5%	86.0%	55%	37 bp	5.7
Small4_S14_R2_001 (control)	51.8%	84.5%	55%	38 bp	5.7

El alineador que refleja una mayor tasa de alineamiento fue BWA.

Las lecturas se alinearon utilizando los programas BWA, Bowtie 1 y Bowtie 2 que Ziemann y col. (133) refieren son los más adecuados para el análisis de RNAs pequeños. El alineador de alta velocidad HISAT no fue considerado porque la tasa de alineamiento fue menor al 0.01%, en una primera prueba. Al comparar las tasas de alineamiento se encontró que BWA y Bowtie 2 mostraron un rango de alineamiento del 1.17-23.51%, el porcentaje de alineamiento con Bowtie1 fue muy bajo, por lo que quedó descartado. Entre los diferentes parámetros empleados, el de BWA (-t 10 sampe) que realiza alineamiento de extremos emparejados, mostró

los porcentajes más altos de alineamiento (tabla 8). Con respecto a Bowtie 2 (-p10 --end-to-end --very-sensitive) que también realiza alineamiento de extremos emparejados, mostró mayor porcentaje de alineamiento, pero no tan alto como con BWA. Entre los resultados de alineamiento que genera Bowtie son: tasa de alineamiento, lecturas procesadas, lecturas con al menos un alineamiento, lecturas con alineamientos suprimidos debido a la opción -m, y el reporte de alineamientos de extremos emparejados. Mientras que en BWA, se reporta el número total de lecturas con control de calidad aprobado y lecturas con error de control de calidad, porcentaje de alineamiento, número de lecturas emparejadas.

Tabla 8. Parámetros y tasas de alineamiento.

Software de alineamiento	Parámetros de alineamiento	Small3 ALL	Small4 Control
Bowtie 1 (v1.3.0)	--tryhard	0.10%	0.08%
	--best	0.10%	0.05%
	-p10 -a --best --strata -k 1 -m 1 -x	0.10%	0.05%
	-p10 --tryhard --best -k 1 -m 1 -S -x	0.10%	0.05%
Bowtie 2 (102)	--very-sensitive-local	1.04%	1.40%
	--very-sensitive	1.86%	1.29%
	--end-to-end	1.76%	1.17%
	-p10 --local --very-sensitive-local	1.13%	1.50%
	-p10 --end-to-end --very-sensitive	1.90%	1.32%
BWA (v0.7.12)	-t 10 sampe	7.63%	3.55%

El conteo de lecturas es mayor en muestras alineadas con BWA.

Una vez que se realizó el conteo con Htseq se registraron los recuentos de los genes en las muestras. En la muestra Small3_S13 (caso ALL), alineada con BWA se identificaron 60664 IDs, de los cuales 2334 presentaron un conteo mayor a 10, para la muestra Small4_S14 (control) igual se encontraron 60664 IDs, de los cuales 707 tuvieron un conteo mayor a 10. Para las muestras alineadas con Bowtie2, Small3_S13 (caso ALL) presentó 60664 IDs, de los cuales 556 tenían un conteo mayor a 10, la muestra Small4_S14 (control) igual tenía 60664 IDs, de los cuales 179 presentaron un conteo mayor a 10.

Se identificaron seis miRNAs en el caso de ALL y tres miRNAs en el control.

Después del conteo, se ingresó la lista de IDs de Ensembl a DAVID Bioinformatics Resource para corroborar a qué miRNA corresponden (tabla 9). En la muestra del

caso que se alineó con BWA se identificaron a MIR221, MIR6746, MIR137HG, MIR4300HG, MIR4435-2HG y MIR762HG. En la muestra control se identificaron a MIR375, MIR3667HG y MIR663AHG. En las muestras alineadas con Bowtie 2, la muestra de ALL no presentó ningún miRNA y la del control solo MIR3667HG, dicho RNA está presente en ambos alineamientos. Los MIR221 y MIR375 se han relacionado con diferentes vías de señalización (figura 12). También se observó la presencia de lncRNAs (Anexo 3).

Tabla 9. microRNAs identificados en el caso de ALL y su control.

Gene ID	Conteo	BWA (caso ALL)
ENSG00000207870	30	microRNA 221 (MIR221)
ENSG00000172965	20	MIR4435-2 host gene(MIR4435-2HG)
ENSG00000225206	14	MIR137 host gene (MIR137HG)
ENSG00000260083	14	MIR762 host gene(MIR762HG)
ENSG00000245832	13	MIR4300 host gene(MIR4300HG)
ENSG00000277892	13	microRNA 6746(MIR6746)
		BWA (control)
ENSG00000188511	52	MIR3667 host gene(MIR3667HG)
ENSG00000225190	33	MIR663A host gene(MIR663AHG)
ENSG00000198973	18	microRNA 375(MIR375)
		Bowtie 2 (caso ALL)
Ninguno	-	No identificados
		Bowtie 2 (control)
ENSG00000188511	52	MIR3667 host gene(MIR3667HG)

FASE 2

Descripción de la población

En este estudio se incluyeron 47 casos y 47 controles, los casos se seleccionaron de forma aleatoria y se tomaron en cuenta los criterios que a continuación se mencionan:

- 1) Casos con diagnóstico confirmado y controles sin cáncer, pareados por edad y sexo, 196 muestras.
- 2) Se realizó extracción de microRNA de casos y controles sin cáncer, total de muestras procesadas 122.
- 3) Se eligieron las muestras con una concentración de RNA >0.18 ng/ μ L y con relación $260/280 \geq 1.8$. Se descartaron 28 muestras que no cumplieron dichos parámetros, quedando un total de 94 muestras (47 casos y 47 controles).

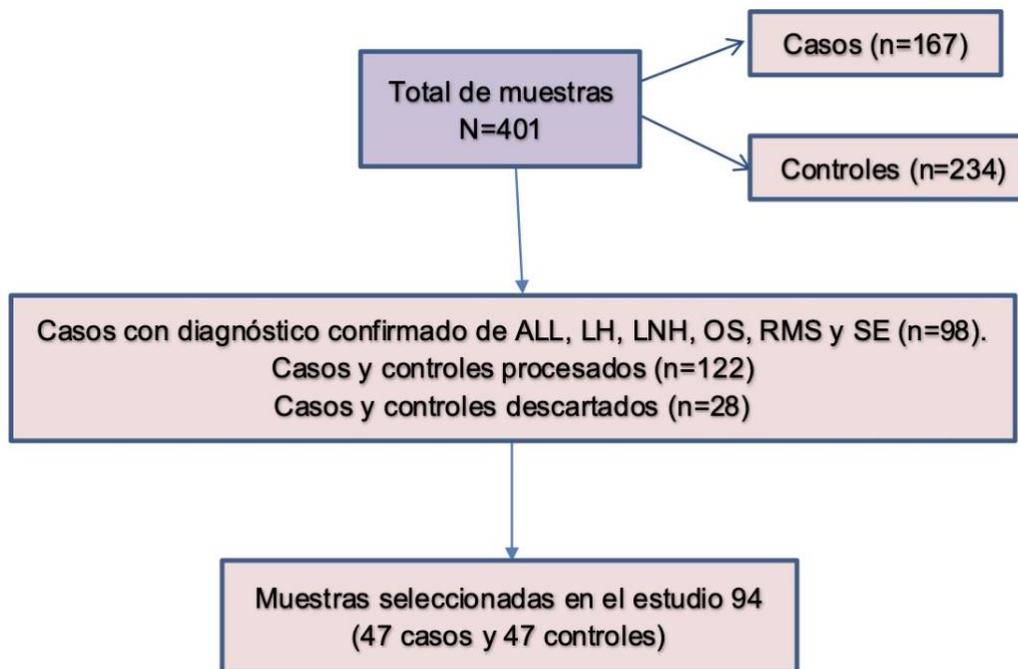


Figura 13. Selección de muestras.

Se compararon las características sociodemográficas y socioeconómicas de las 94 muestras, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, excepto en nivel socioeconómico p 0.007 (tabla 10). Los casos fueron captados en el Instituto Nacional de Pediatría (48.9%) y del Centro Médico Nacional 20 de noviembre (51.1%). La mayoría de los controles fueron captados en Colegios (46.8%) y en la Clínica de odontopediatría (40.4%). La distribución del sexo en ambos grupos fue de 32 masculinos (68.1%) y 15 femeninos (31.9%). El promedio de edad para casos fue de 11.30 años (± 3.63 DE) y para controles 11.26 (DE ± 3.64). El 46.8% de los casos eran residentes de la Ciudad de México y 19.1% del Estado de México, en cuanto a controles el 74.5% residían en Ciudad de México. El nivel socioeconómico, de acuerdo a su estatus económico, educativo y social refiere para ambos grupos pertenecían al nivel socioeconómico D, nivel bajo inferior.

En cuanto al diagnóstico y características oncológicas (tabla 11), la mayor frecuencia fue Leucemia Aguda Linfoblástica (21.3%), Linfomas de Hodgkin (17%), Linfoma no Hodgkin (17%), Rbdomiosarcoma (10.6%), Osteosarcoma (14.9%) y Sarcoma de Ewing (19.1%). El 57.4% de los casos refiere tener antecedentes familiares de cáncer y de los controles el 51.1%.

Tabla 10. Características sociodemográficas y socioeconómicas de casos y controles.

Características	Casos n=47	Controles n=47	p-value
Edad media/DE, n(%)	11.29 \pm 3.63	11.25 \pm 3.64	0.95
3-7 años	8 (17.1)	8 (17.1)	
8-12 años	19 (40.5)	19 (40.5)	
13-17 años	20 (42.1)	20 (42.1)	
Sexo n(%)			
Masculino	32 (68.1)	32 (68.1)	0.82
Femenino	15 (31.9)	15 (31.9)	

Lugar de colección (n/%)			
INP	23 (48.9)	2 (4.3)	2.2 ⁻¹⁶
20 de Nov.	24 (51.1)	1 (2.1)	
Clínica Odontopediatría	-	19 (40.4)	
Clínica Admisión	-	1 (2.1)	
Escuela/Colegio	-	22 (46.8)	
Otro	-	2 (4.3)	
Lugar de nacimiento (n/%)			
Cd. México	22 (46.8)	35 (74.5)	0.07
Chiapas	1 (2.1)	-	
Chihuahua	1 (2.1)	-	
Durango	-	1 (2.1)	
Guerrero	4 (8.5)	-	
Guanajuato	-	1 (2.1)	
México	9 (19.1)	5 (10.6)	
Michoacán	2 (4.3)	1 (2.1)	
Morelos	1 (2.1)	1 (2.1)	
Oaxaca	2 (4.3)	1 (2.1)	
San Luis Potosí	1 (2.1)	-	
Sinaloa	2 (4.3)	-	
Tlaxcala	1 (2.1)	-	
Veracruz	1 (2.1)	1 (2.1)	
Otro país	-	1 (2.1)	
Nivel Socioeconómico (n/%)			
A/B	1 (2.1)	7 (14.9)	0.0007
C+	4 (8.5)	9 (19.1)	
C	5 (10.6)	3 (6.4)	
C-	11 (23.4)	2 (4.3)	
D+	1 (2.1)	10 (21.3)	
D	19 (40.4)	15 (31.9)	
E	1 (2.1)	1 (2.1)	
Perdidos	5 (10.6)	7 (14.9)	

Tabla 11. Características oncológicas de casos.

Características oncológicas	Casos (%) n=47	Características oncológicas	Casos (%) n=47
Diagnóstico	10 (21.3)	Tratamiento	
Leucemia Linfoblástica Aguda	8 (17.0)	Quimioterapia	
Linfoma Hodgkin	8 (17.0)	Sí	34 (72.3)
Linfoma no Hodgkin	5 (10.6)	No	10 (21.3)
Rabdomiosarcoma	7 (14.9)	Perdido	3 (6.4)
Sarcoma de Ewing	9 (19.1)	Radioterapia	
Osteosarcoma		Sí	11 (23.4)
		No	27 (57.4)
		Perdido	9 (19.1)
Grupo de riesgo		Estado actual del paciente	
Bajo riesgo	6 (12.8)	Muerto por enfermedad	6 (12.8)
Alto riesgo	32 (68.1)	Vivo con enfermedad	13 (27.7)
Estadío		Vivo en vigilancia	16 (34.0)
II	1 (2.1)	Desconocido	1 (2.1)
III	5 (10.6)	Enviado a cuidados paliativos	6 (12.8)
IV	6 (12.8)	Perdido	5 (10.6)
Perdido	35 (74.5)		
Metástasis			
Sí	8 (17.0)		
No	31 (66.0)		
Perdidos	8 (17.0)		

Se realizó la extracción de miRNAs de casos y controles.

El kit empleado en este estudio fue miRVANA, el miRNA exosomal se obtuvo de un volumen de 1000 µL de sobrenadante de saliva para asegurar una concentración >0.18 ng/µL. La concentración promedio de miRNA de las 94 muestras seleccionadas para este estudio (tabla 12) fue 2.16 ng/µL ±3.51, el rango de concentración es de 0.18-23.8 ng/µL. La concentración de miRNAs de casos fue de 1.80 ng/µL (0.18-13.15, ±3.11) y de controles 2.52 ng/µL (0.19-23.8, ±3.86), p 0.021 por lo tanto presentan una diferencia estadísticamente significativa. De las 122 muestras procesadas para extracción de miRNAs, 28 muestras fueron descartados por baja concentración o porque no tenían pareja.

Tabla 12. Concentraciones de miRNA y cDNA obtenidas en las muestras procesadas.

Muestra	Pareja	ID	[miRNA]	[cDNA]	Muestra	Pareja	ID	[miRNA]	[cDNA]
Leucemia	1	1	0.18	84.00	Control	38	72	0.19	16.20
Leucemia	4	4	0.21	-	Ewing	24	73	3.76	34.40
Leucemia	5	5	0.43	72.30	OSM	33	74	0.28	82.60
Leucemia	6	6	0.31	68.40	Control	33	76	0.20	7.87
LH	10	7	0.22	43.00	Leucemia	8	79	0.56	17.75
LH	40	8	0.21	15.75	LNH	29	80	1.27	27.40
LH	27	11	1.79	47.00	Ewing	16	81	0.19	28.30
Control	1	12	2.08	63.70	OSM	34	82	0.19	24.10
Control	4	15	2.03	54.20	Ewing	36	83	0.95	31.60
Control	5	16	2.07	38.90	Control	8	84	1.47	14.75
Control	6	17	6.31	78.70	Control	34	87	0.94	15.80
Control	10	18	0.66	37.40	Control	36	88	1.72	61.30
Control	40	19	1.13	74.50	OSM	25	89	0.22	16.30
Control	27	22	4.26	70.70	RMS	42	96	0.24	13.65
LH	31	23	0.47	64.30	Control	42	97	0.21	41.10
LNH	2	24	0.52	28.50	LH	45	98	0.20	66.70
LNH	11	25	0.76	58.20	Control	45	100	2.04	-
LNH	12	26	1.28	66.90	LH	47	103	1.76	-
LNH	13	27	2.03	38.70	Control	47	104	0.28	-
LNH	21	28	1.15	17.80	Control	37	105	2.90	-
RMS	39	30	0.19	33.60	Control	2	106	3.24	23.60
RMS	18	31	13.15	60.30	Ewing	22	107	4.66	98.50
RMS	14	32	3.07	46.50	Control	24	109	0.79	73.00
Ewing	9	35	1.65	35.20	Control	25	110	6.18	72.70
Control	29	36	5.80	7.94	Control	28	111	3.46	95.80
Control	11	38	0.62	52.30	Control	39	112	0.23	15.55
Control	12	39	0.44	56.70	Control	23	113	4.56	65.90
Control	18	44	1.94	64.90	LNH	41	115	1.58	-
Control	14	45	0.27	37.70	Control	13	116	23.80	23.90
Control	22	47	0.78	49.60	Control	21	117	0.83	103.50
Ewing	19	49	0.42	42.10	Control	41	118	4.76	-
Ewing	20	50	0.52	48.30	LH	37	119	0.28	-

OSM	26	52	1.25	30.70	RMS	44	120	2.98	18.70
OSM	30	53	0.49	51.70	Control	3	121	11.25	27.40
OSM	35	54	12.50	79.20	Leucemia	3	122	1.02	24.10
OSM	15	55	0.59	43.60	Control	44	123	4.44	54.20
OSM	28	56	0.20	72.90	Leucemia	7	124	12.80	-
Leucemia	23	57	0.38	41.40	Control	7	125	0.78	-
LH	32	59	0.22	51.40	Leucemia	48	126	1.34	19.50
LNH	38	60	0.18	45.70	Control	48	127	0.65	10.65
Control	19	61	0.22	49.90	RMS	49	128	1.70	16.30
Control	20	62	6.24	43.50	Control	49	129	2.11	24.10
Control	26	64	4.55	63.20	Control	31	130	0.72	79.50
Control	30	65	2.73	26.90	Control	9	131	2.77	60.40
Control	35	66	0.62	20.90	Control	16	132	1.74	78.30
Control	15	67	1.17	21.70	Control	32	133	0.37	86.90

Se elaboraron las bibliotecas de 82 muestras para su posterior secuenciación.

La concentración promedio de cDNA obtenido de las bibliotecas fue de 46.01 ng/ μ L \pm 24.08, también se llevó a cabo el análisis de integridad de ADN mediante Tapestation en el 10% de las muestras, el cual corroboró la presencia de miRNAs entre las bandas de 150-200 pb (figura 14, A), el tamaño promedio fue de 161 pb. Las muestras que no cumplieron con este parámetro fueron descartadas para el ensayo de secuenciación, al igual que 5 parejas que no fueron procesadas (tabla 9), así que el número de muestras consideradas fue de 79, divididas en dos grupos. El volumen total de cada biblioteca será considerado para dos ensayos, con y sin el paso de selección de tamaño. Este último se encuentra en proceso de secuenciación.

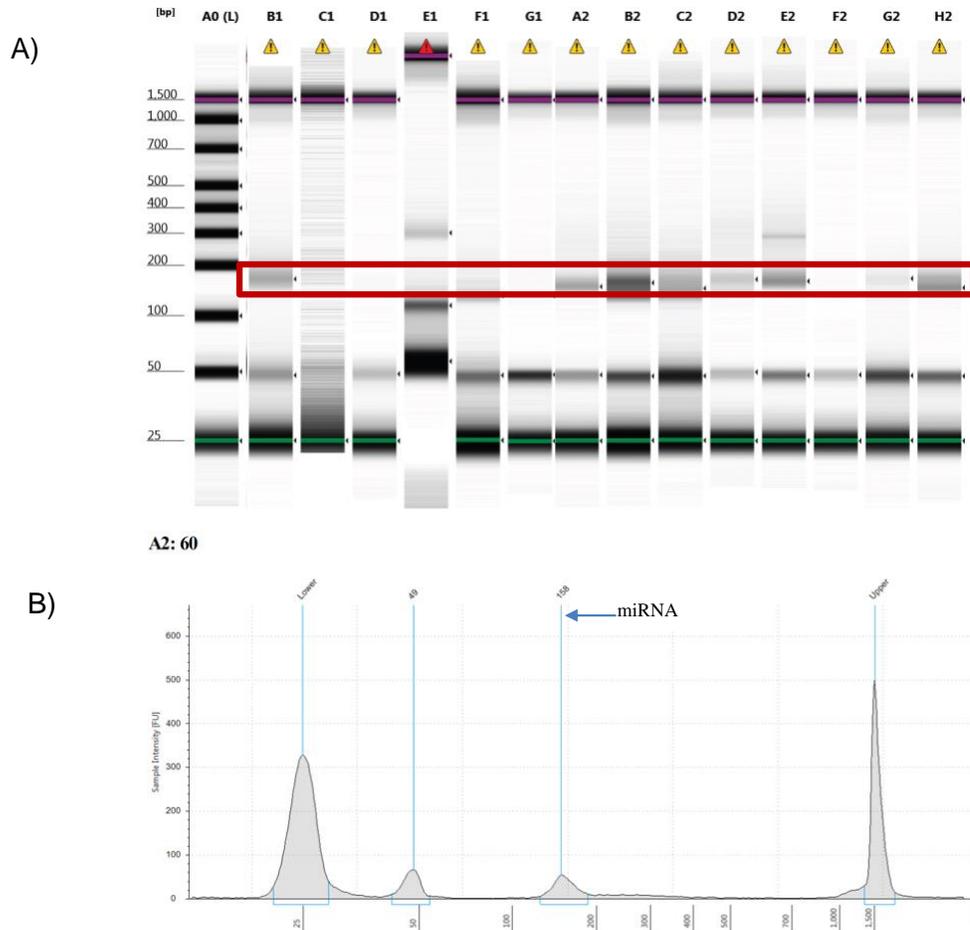


Figura 14. Integridad del cDNA de las bibliotecas.

A) Imagen de gel después de someterse al bionalizador TapeStation, se observa en el primer carril izquierdo el MPM (A0) y los demás carriles corresponden a cDNA de las muestras (B1-H1). En el recuadro rojo se indica la banda representativa de los miRNAs, de aproximadamente 140-180 pb, la otra banda que se presenta también es la de los adaptadores a 50 pb, la presencia de otras bandas indica contaminación. B) Electroferograma correspondiente a las imágenes de gel de la muestra A2 (ID 60) con un pico en 158 pb (miRNAs) y en 49 pb (adaptadores). El eje x del electroferograma representa el tamaño del cDNA (pb), mientras que el eje y representa la respuesta de medición de las unidades de fluorescencia (FU).

9 DISCUSIÓN

El uso de la saliva como biofluido de diagnóstico ha sido ampliamente reconocido y tiene muchas ventajas sobre otras muestras como la sangre, orina y otros biofluidos (105). Los biomarcadores salivales tienen el potencial de servir como herramientas de detección no invasivas y ampliamente accesibles. De hecho, la recolección es económica y se puede realizar fácilmente, por lo que resulta ser una excelente opción para pacientes pediátricos.

Varios estudios describen la posibilidad de detectar biomarcadores de ARN de algunas enfermedades por medio de exosomas salivales y más concretamente miRNAs asociados a cáncer, debido a su expresión específica y estabilidad para su medición en dichas nanoestructuras (87, 95).

En este trabajo, de acuerdo con la evidencia anterior, nos enfocamos en estandarizar los métodos empleados para la identificación de miRNAs exosomales de pacientes pediátricos con cáncer y sin cáncer por medio de secuenciación masiva paralela. Se aislaron de forma exitosa los exosomas de saliva, a partir del kit "Total exosome isolation", una técnica de purificación rápida, simple y efectiva de exosomas. Encontramos que las características morfológicas y moleculares de las nanopartículas eran consistentes con los exosomas reportados en Vesiclepedia (33). Morfológicamente, el ensayo TEM mostró que los exosomas presentan forma redonda, rodeada por una membrana de bicapa lipídica, con diámetros que oscilan entre 30-110 nm y con presencia de proteínas alrededor de las nanovesículas. Si bien, la técnica estándar para la caracterización de exosomas es la microscopía electrónica, Sharman y col. investigaron las características morfológicas utilizando AFM de alta resolución de exosomas salivales derivados de pacientes sanos y pacientes con cáncer oral, reportando que los exosomas cancerosos aumentan significativamente en la saliva y muestran morfologías irregulares, tamaño de vesícula aumentado y mayor agregación intervesicular (106). La identificación de marcadores como las tetraspaninas CD81, CD9, CD63, la proteína de choque térmico HSP70 y GAPDH confirmaron la naturaleza exosomal de las

nanoestructuras, Ogawa y col. refieren también incluir marcadores como Alix y Tsg101 que son proteínas presentes en ambos tipos de exosomas salivales (32).

Para extraer el ARN exosómico de saliva, los kits comerciales disponibles y más eficientes fueron miRNeasy (15.01 ng/μL ±7.78) y miRVANA (15.37 ng/μL ±3.64). Feng Li y col. en un estudio de ARN extracelular de saliva humana libre de células (SFC) reportan que el kit miRNeasy mostró el mayor rendimiento de ARN total, mientras que miRVANA ocupa el tercer lugar en rendimiento, aunque en su metodología no reportan el volumen de SFC empleado (107). Otros autores refieren el empleo de un volumen de SFC de 200 μL o 500 μL para extraer ARN total (108, 109), mientras que Ogawa y col. sugieren 1 mL de saliva total para ARN total y 30 mL de saliva total para el aislamiento de RNA exosómico (31), el cual resulta ser un volumen excesivo para pacientes pediátricos. Con respecto a nuestros resultados, se sugiere un volumen de 1mL de sobrenadante de saliva para extraer una concentración mayor de miRNAs exosomales. Las muestras de 3 casos de ALL y sus respectivos controles (tabla 4) nos permitió establecer el rango de concentración de miRNA exosomal, el cual debe ser ≥ 0.18 ng/μL para la elaboración de bibliotecas. La concentración de miRNA exosómico del grupo de estudio para casos fue de 1.80 ng/μL (0.18-13.15, ±3.11) y de controles 2.52 ng/μL (0.19-23.8, ±3.86), con una diferencia estadísticamente significativa (p 0.021). Aparte de las cuantificaciones por Nanodrop y Qubit, también es importante hacer un ensayo en el bioanalizador TapeStation para verificar el tamaño dominante del ARN exosomal de saliva, Lässer y col. demostraron que el ARN exosomal contiene principalmente ARN pequeño y escaso o nulo ARN ribosomal (18S y 28S) (19).

Los miRNAs, desempeñan un papel crucial en la modulación de varios procesos patogénicos de cánceres a través de su interacción con el ARNm diana (52), con el avance de las tecnologías de secuenciación, se ha convertido en una herramienta idónea para la elaboración de perfiles de miRNA, dando lugar al descubrimiento de nuevos biomarcadores en cáncer pediátrico (107). La preparación de bibliotecas es un paso clave en la secuenciación. Con este reporte preliminar de preparación de bibliotecas y secuenciación, se establecieron parámetros para el grupo de estudio

de la fase 2, casos y controles. La elaboración de bibliotecas se realizó con mínimo 1.8 ng de RNA exosómico y se aumentó de 25 a 27 ciclos de PCR para asegurar un mayor rendimiento de cDNA, en total se generaron 79 bibliotecas para secuenciación y un control positivo de miRNA, las muestras analizadas en TapeStation tienen un tamaño promedio de 161 pb, que corresponde a la longitud del inserto de miRNA que incluye los adaptadores 3' y 5', por lo tanto los fragmentos generados en la mayoría de las muestras corresponde al tamaño esperado, que se encuentra entre 150 y 180 pb (110). Olivares y col. realizaron la optimización de un protocolo de bibliotecas de miRNAs exosomales de orina, demostraron que las lecturas mapeadas de miRNAs fueron más altas en las muestras purificadas en gel en comparación con las no purificadas (111). Por lo tanto, se propone para próximos ensayos que la elaboración de bibliotecas incluya una concentración homogénea de ARN, con selección de tamaño por PAGE y sin limpieza, para poder comparar el porcentaje de lecturas mapeadas entre ambos protocolos.

Para estandarizar el protocolo de análisis bioinformático de miRNAs, se compararon diferentes herramientas. El mapeo de lecturas es un paso inicial en el análisis de datos de RNA-seq, por lo tanto, la elección del software de alineamiento puede influir en la expresión diferencial o la identificación de nuevos miRNAs. Se mostraron mejores resultados en la tasa de alineamiento con BWA (3.55-7.63%) comparados con Bowtie1 y Bowtie 2, los parámetros de alineamiento de extremo a extremo (-end-to-end) presentaron mayor porcentaje de alineamiento con respecto al alineamiento local, Mark Ziemann y col. evaluaron diferentes herramientas de alineamiento con datos de microRNA humano (112), ellos destacan que Bowtie 1, Bowtie 2, BWA, HISAT y MicroRazer son los programas más precisos para el alineamiento de pequeños RNAs. Shirley Tam y col. realizaron otro estudio donde evaluaron BWA, Bowtie 2, Bowtie1, y Novaling, ellos sugieren el uso de BWA porque conduce a resultados más precisos para análisis posteriores como la expresión diferencial (113). Bas W. y col. reportan una tasa de alineamiento del 38.4% de pequeños RNAs con Bowtie 1, en exosomas de células epiteliales (114), Ogawa y col. refieren una tasa de alineamiento de 0.6-3.9% de pequeños RNAs de exosomas

salivales (31), dichos porcentajes coinciden con los resultados obtenidos empleando BWA y Bowtie 2 (ver tabla 8).

En la muestra correspondiente al caso se identificaron seis miRNAs, miR221, miR6746, MIR137HG, MIR4300HG, MIR4435-2HG y MIR762HG, en la muestra control se identificaron tres, miR375, MIR3667HG y MIR663AHG. De los miRNAs asociados a cáncer, se reportan a miR221, el cual se relaciona con neoplasias malignas de mama, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, glioma y enfermedades inflamatorias (115) y miR375 sobrerregulado está asociado con diabetes tipo 2, la formación amiloide en islotes pancreáticos y el déficit de células β , también se sabe que actúa como un supresor de tumores en la mayoría de las células tumorales y juega un papel importante en la proliferación, apoptosis, migración e invasión de células tumorales al unirse a genes diana (116, 117).

También se identificaron lncRNAs, los cuales se han reportado juegan un papel importante en cáncer (118). Olivares y col. mencionan que la presencia de lncRNA y mRNA puede haber sido causada por la degradación parcial de ARN en el procedimiento de extracción de ARN o preparación de bibliotecas. Otra posible explicación para la presencia de estos RNAs es que los exosomas funcionan como reservorios de mRNA degradado y de lncRNA derivado del citosol (119).

10 CONCLUSIÓN

Se logró aislar y caracterizar los exosomas de forma exitosa en muestras de saliva de pacientes pediátricos. Aunque la concentración de miRNAs fue baja, resulta ser suficiente para elaborar las bibliotecas de secuenciación y llevar a cabo en un futuro la identificación de los diferentes perfiles de expresión de miRNAs en casos y controles. El estudio preliminar que se realizó nos permitió avanzar en la estandarización del protocolo de análisis bioinformático, establecer que programas de alineamientos y parámetros son útiles, por lo tanto las fases concluidas nos permitieron conocer qué miRNAs presentan las muestras y las características necesarias que deben cumplir éstas para futuros ensayos.

ANEXO 1

Tabla 13. miRNAs en cáncer.

Cáncer	miRNA	Blancos	Referencia
Cáncer de cerebro	miR-21↑, miR-221↑, miR-181↓	BCL2, kit, Tcl-1	(120-122)
Cáncer de mama	miR-125b↓, miR-145↓, miR-21↓, miR-155↓	No identificados	(123)
Leucemia linfocítica crónica	miR-15↓, miR-16↓	BCL2	(124)
Neoplasia colorrectal	miR-143↓, miR-145↓	No identificados	(125)
Carcinoma hepatocelular	miR-18↑, miR-224↑, miR-199↓, miR-195↓, miR-200↓, miR-125↓	No identificados	(126)
Cáncer de pulmón	let-7↓, miR-17-92↑	RAS y MYC	(127, 128)
Linfomas	miR-155↑, miR-17-92↑	BIC	(129, 130)
Carcinoma papilar de tiroides	miR-221↑, miR-222↑, miR-146↑, miR-181↑	KIT	(131, 132)
Tumores testiculares de células germinales	miR-372↑, miR-373↑	LAST2	(133)

miRNAs relacionados con cáncer y sus posibles genes dirigidos. Todos estos datos sugieren que los miRNAs juegan un papel importante en el cáncer humano. Modificada de “microRNAs as oncogenes and tumor suppressors”, de Baohong Zhan y col., flecha arriba (↑) representa que la expresión de los miRNAs aumentó, flecha abajo (↓) representa que la expresión de los miRNAs disminuyó en ese tipo de cáncer (134).

ANEXO 2

Análisis bioinformático

Pre-procesamiento de los datos de secuenciación

Todos los programas fueron ejecutados desde la línea de comandos de la terminal Ubuntu Server v20.10, proporcionado por el Laboratorio de Cómputo de Alto Rendimiento perteneciente a la Coordinación del Departamento de Matemáticas de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Control de calidad

Los archivos fastq fueron analizados con FastQC v1.11 y MultiQC v1.11 (135) para el primer análisis de calidad. Posteriormente se recortaron las secuencias con TrimGalore (v0.6.4, con Cutadapt v2.10), herramienta que en automático detecta y elimina las secuencias del adaptador 3' (5'-TGGAATTCTCGG-3') que se agregaron en la construcción de la biblioteca. Los parámetros empleados fueron : -j 1 -e 0.1 -q 20 -O 1 -a, donde -j es el número de núcleos usados para el corte, -e es la tasa máxima de error de corte, -q conserva las secuencias que tengan una calidad superior a 20 en escala Phred, -O es el parámetro mínimo de adaptadores superpuestos y -a corresponde con la secuencia del adaptador 3'. Se filtraron las secuencias menores a 18 pb y la longitud de corte fue de 35 pb. Por último, se visualizó el reporte del análisis de calidad generado con MultiQC a partir de las muestras recortadas. En resumen, se ejecutaron las siguientes instrucciones:

```
Fastqc archivo1_R1.fastq archivo1_R2.fastq  
trim_galore --fastqc --paired --retain_unpaired /archivo1_R1.fastq /archivo1_R2.fastq  
multiqc .
```

En donde:

Archivo1_R1.fastq y Archivo1_R2.fastq corresponden a los archivos con las lecturas pareadas.

--fastqc, ejecuta FastQC en modo predeterminado una vez que se complete el recorte.

--paired, realiza el recorte en archivos con extremos pareados.

--retain_unpaired, esta opción indica que si solo una de las secuencias de extremos pareados es demasiado corta, la secuencia más larga se escribirá en cualquiera de los archivos .unpaired_1.fq.

Alineamiento

La alineación de secuencias es el proceso mediante el cual descubrimos cómo y dónde las secuencias de lectura son similares a la secuencia de referencia. Las lecturas se alinearon utilizando los programas BWA (136), Bowtie 1 (137) y Bowtie 2 (138).

Para poder realizar el alineamiento se generó un índice de referencia del genoma humano GRCh38: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.26/.

El archivo del genoma se descargó en formato fasta Homo_sapiens.GRCh38.dna_sm.primary_assembly.fa.

Para Bowtie 1 y Bowtie 2 se creó el mismo índice, con la siguiente instrucción:

```
Bowtie2-build -p9 Homo_sapiens.GRCh38.dna_sm.primary_assembly.fa genome
```

En donde:

Bowtie2-build, indexa el genoma de referencia.

-p 9, especifica el número de hilos/núcleo que se utilizarán en el servidor.

genome, nombre que se le dió al índice.

Para el índice de referencia en BWA se siguió la siguiente instrucción:

```
bwa index Homo_sapiens.GRCh38.dna_sm.primary_assembly.fa index_prefix
```

En donde:

bwa index , indexa el genoma de referencia.

Index_prefix, es el nombre que se le dió al índice.

Posteriormente se realizó el alineamiento con los siguientes parámetros (tabla 14). Los parámetros que generaron mayor porcentaje de alineamiento se seleccionaron para continuar con la cuantificación.

Tabla 14. Software y parámetros de alineamiento .

Software de alineamiento	Parámetros de alineamiento	Referencia de parámetros usados
Bowtie 1 (v1.3.0)	--tryhard	(137)
	--best	
	-p10 -a --best --strata -k 1 -m 1 -x	(112)
	-p10 --tryhard --best -k 1 -m 1 -S -x	
Bowtie 2 (102)	--very-sensitive-local	(138)
	--very-sensitive	
	--end-to-end	
	-p10 --local --very-sensitive-local	(112)
	-p10 --end-to-end --very-sensitive	
BWA (v0.7.12)	-t 10 sampe	(136)

Se siguió la siguiente instrucción para el alineamiento con Bowtie 1.

```
bowtie -p10 -a --best --strata -k 1 -m 1 -x ./04_REFERENCE/genome -1
./03_TRIMMING_GALORE/Small4_S14_R1_001_val_1.fq -2
./03_TRIMMING_GALORE/Small4_S14_R2_001_val_2.fq -S ./05_MAPPING_BWT1/Small4_b1.sam
```

En donde:

- p 10, especifica el número de hilos/núcleos que se utilizarán en el servidor.
- a --best --strata, reporta todos aquellos alineamientos en el mejor “estrato”, es decir, las que tienen la menor cantidad de desajuste.
- k 1, informa hasta un alineamiento válido.
- m 1, se abstiene de reportar alineamientos de lecturas que tengan más de un alineamiento.
- x, es el nombre base del índice para el genoma de referencia.
- 1, es la ubicación de val_1.fq
- 2, es la ubicación de val_2.fq
- S, las lecturas alineadas en formato SAM.

--tryhard, encuentra alineamientos válidos, incluidos aquellos de extremos emparejados.

Para el alineamiento con Bowtie 2 se colocó:

```
bowtie2 -p10 --end-to-end --very-sensitive -x ./04_REFERENCE/genome -1
./03_TRIMMING_GALORE/Small1_S11_R1_001_val_1.fq -2
./03_TRIMMING_GALORE/Small1_S11_R2_001_val_2.fq -S ./05_MAPPING/Small1_bt2.sam
```

En donde:

-p10, especifica el número de hilos/núcleos que se utilizarán en el servidor.

--very-sensitive-local, corresponde a: -D 20 -R 3 -N 0 -L 20 -i S,1,0.50.

(-D, es el número de intentos consecutivos (hasta 20) de extensión de semillas que pueden "fallar" antes de que bowtie2 avance; -R, 3 es el número máximo de veces que bowtie2 "resembrará" lecturas con semillas repetitivas; -N, es el número de discrepancia en un alineamiento semilla 0; -L, es la longitud de subcadenas de semillas 20; -i S, establece la función del intervalo, $f(x)=1+0.50*\sqrt{x}$, donde x es la longitud de lectura).

--end-to-end --very-sensitive, igual que: -D 20 -R 3 -N 0 -L 20 -i S,1,0.50.

-x, es el nombre base del índice para el genoma de referencia.

-1, es la ubicación de val_1.fq

-2, es la ubicación de val_2.fq

-S, las lecturas alineadas en formato SAM.

Y por último el alineamiento con BWA:

```
bwa aln -t 10 hg38 Small4_S14_R1_001_val_1.fq > small4_r1.sai
bwa aln -t 10 hg38 Small4_S14_R2_001_val_1.fq > small4_r2.sai

bwa sampe hg38 small4_r1.sai small4_r2.sai
Small4_S14_R1_001_val_1.fq Small4_S14_R2_001_val_2.fq > small4_pe.sam

samtools view -S -b small4_pe.sam > Small4_bwa1.bam
samtools sort -O bam -o Small4_bwa1.sorted.bam -T temp Small4_bwa1.bam
samtools flagstat Small4_bwa1.sorted.bam
```

En donde:

aln -t 10, generó el alineamiento con 10 subprocessos.

bwa sampe, originó alineamientos de extremos emparejados.

Se utilizó Samtools v1.10 (139) para cambiar de formato las lecturas alineadas de SAM a BAM; la opción sort permitió ordenar los alineamientos por coordenadas, y la opción flagstat mostró las estadísticas del alineamiento.

Conteo de lecturas alineadas

Una vez que las lecturas se alinearon con el genoma GRCh38, se cuantificó el mapeo de las lecturas con genes mediante el uso de Htseq v0.13.5 (140).

```
htseq-count --stranded=no ./05_MAPPING_BWT2/Small4_bt2.sorted.bam
./04_REFERENCE_BWT2/Homo_sapiens.GRCh38.104.gtf >
./06_COUNTS_BWT2/Small4_S1bt2_counts.txt

htseq-count --stranded=no ./05_MAPPING_BWT2/Small4_bwa1.sorted.bam
./04_REFERENCE_BWT2/Homo_sapiens.GRCh38.104.gtf >
./06_COUNTS_BWT2/Small4_S14bwa_counts.txt
```

En donde:

Htseq-count --stranded=no, se considera que una lectura se mapea con una característica (e.g., gen), independientemente de si se asigna a la misma hebra o a la opuesta.

El archivo de salida se creó en formato txt.

Identificación de miRNAs (vías de señalización)

Después del conteo los datos se exportaron y ordenaron en un archivo .xlsx y la lista de IDs de Ensembl se ingresó a DAVID Bioinformatics Resource (<https://david.ncifcrf.gov/>) para poder identificar a qué miRNAs correspondían y las vías de señalización asociadas.

ANEXO 3

Tabla 15. IncRNAs identificados en las muestras de saliva correspondientes a caso de ALL y su control.

ID GEN	CONTEO	RNA SMALL3_S13_BWA (CASO ALL)
ENSG00000227744	56	long intergenic non-protein coding RNA 1940(LINC01940)
ENSG00000258476	51	long intergenic non-protein coding RNA 2207(LINC02207)
ENSG00000260737	46	long intergenic non-protein coding RNA 1227(LINC01227)
ENSG00000228888	34	long intergenic non-protein coding RNA 1428(LINC01428)
ENSG00000221953	34	long intergenic non-protein coding RNA 2897(LINC02897)
ENSG00000227060	34	long intergenic non-protein coding RNA 629(LINC00629)
ENSG00000233723	32	long intergenic non-protein coding RNA 1122(LINC01122)
ENSG00000267659	32	long intergenic non-protein coding RNA 1482(LINC01482)
ENSG00000181995	31	long intergenic non-protein coding RNA 301(LINC00301)
ENSG00000237401	30	long intergenic non-protein coding RNA 1304(LINC01304)
ENSG00000234988	30	long intergenic non-protein coding RNA 1849(LINC01849)
ENSG00000247213	29	long intergenic non-protein coding RNA 1498(LINC01498)
ENSG00000226808	27	long intergenic non-protein coding RNA 840(LINC00840)
ENSG00000228784	27	long intergenic non-protein coding RNA 954(LINC00954)
ENSG00000234323	26	long intergenic non-protein coding RNA 1505(LINC01505)
ENSG00000240707	25	long intergenic non-protein coding RNA 1168(LINC01168)
ENSG00000214691	25	long intergenic non-protein coding RNA 1913(LINC01913)
ENSG00000242147	24	lncRNA associated with SART3 regulation of splicing(LASTR)
ENSG00000228794	24	long intergenic non-protein coding RNA 1128(LINC01128)
ENSG00000185847	24	long intergenic non-protein coding RNA 1405(LINC01405)
ENSG00000112541	24	long intergenic non-protein coding RNA 473(LINC00473)
ENSG00000226808	24	long intergenic non-protein coding RNA 619(LINC00619)
ENSG00000242147	22	long intergenic non-protein coding RNA 2677(LINC02677)
ENSG00000241288	21	long intergenic non-protein coding RNA 2614(LINC02614)
ENSG00000261455	20	long intergenic non-protein coding RNA 1003(LINC01003)
ENSG00000222005	20	long intergenic non-protein coding RNA 1118(LINC01118)
ENSG00000223768	20	long intergenic non-protein coding RNA 205(LINC00205)
ENSG00000224209	20	long intergenic non-protein coding RNA 466(LINC00466)
ENSG00000189238	19	long intergenic non-protein coding RNA 943(LINC00943)
ENSG00000249145	18	long intergenic non-protein coding RNA 2517(LINC02517)
ENSG00000253394	18	long intergenic non-protein coding RNA 534(LINC00534)
ENSG00000260738	18	long intergenic non-protein coding RNA 554(LINC00554)
ENSG00000227036	18	long intergenic non-protein coding RNA 673(LINC00673)
ENSG00000232837	16	long intergenic non-protein coding RNA 1700(LINC01700)
ENSG00000262585	16	long intergenic non-protein coding RNA 1979(LINC01979)

ENSG00000227036	16	long intergenic non-protein coding RNA 511(LINC00511)
ENSG00000231419	16	long intergenic non-protein coding RNA 689(LINC00689)
ENSG00000205106	15	long intergenic non-protein coding RNA 2716(LINC02716)
ENSG00000260876	14	long intergenic non-protein coding RNA 1229(LINC01229)
ENSG00000257056	14	long intergenic non-protein coding RNA 2282(LINC02282)
ENSG00000279418	14	long intergenic non-protein coding RNA 244(LINC00244)
ENSG00000272549	14	long intergenic non-protein coding RNA 2538(LINC02538)
ENSG00000250334	14	long intergenic non-protein coding RNA 989(LINC00989)
ENSG00000249816	11	long intergenic non-protein coding RNA 964(LINC00964)
ENSG00000279873	10	long intergenic non-protein coding RNA 1126(LINC01126)
ENSG00000253595	10	long intergenic non-protein coding RNA 1300(LINC01300)
ENSG00000225872	10	long intergenic non-protein coding RNA 1529(LINC01529)
ENSG00000256172	10	long intergenic non-protein coding RNA 2420(LINC02420)
ENSG00000224805	10	long intergenic non-protein coding RNA 853(LINC00853)

ID GEN	CONTEO	RNA SMALL3_S13_BWA (CONTROL)
ENSG00000250132	10	long intergenic non-protein coding RNA 2167(LINC02167)
ENSG00000249188	12	long intergenic non-protein coding RNA 2124(LINC02124)
ENSG00000254102	16	long intergenic non-protein coding RNA 2538(LINC02538)
ENSG00000237576	17	long intergenic non-protein coding RNA 2714(LINC02714)
ENSG00000215612	18	long intergenic non-protein coding RNA 205(LINC00205)
ENSG00000205015	18	long intergenic non-protein coding RNA 2138(LINC02138)
ENSG00000170983	24	long intergenic non-protein coding RNA 208(LINC00208)
ENSG00000212694	32	long intergenic non-protein coding RNA 1089(LINC01089)
ENSG00000236609	42	long intergenic non-protein coding RNA 1265(LINC01265)
ENSG00000259867	51	long intergenic non-protein coding RNA 1097(LINC01097)

11 REFERENCIAS

1. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta*. 2007;383(1-2):30-40.
2. Nonaka T, Wong DTW. Saliva-Exosomics in Cancer: Molecular Characterization of Cancer-Derived Exosomes in Saliva. *Enzymes*. 2017;42:125-51.
3. Dawes C, Wong DTW. Role of Saliva and Salivary Diagnostics in the Advancement of Oral Health. *J Dent Res*. 2019;98(2):133-41.
4. Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DT. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(4):781-91.
5. Zhang CZ, Cheng XQ, Li JY, Zhang P, Yi P, Xu X, et al. Saliva in the diagnosis of diseases. *Int J Oral Sci*. 2016;8(3):133-7.
6. Kaczor-Urbanowicz KE, Martin Carreras-Presas C, Aro K, Tu M, Garcia-Godoy F, Wong DT. Saliva diagnostics - Current views and directions. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2017;242(5):459-72.
7. Wang X, Kaczor-Urbanowicz KE, Wong DT. Salivary biomarkers in cancer detection. *Med Oncol*. 2017;34(1):7.
8. Silberring J, Ciborowski P. Biomarker discovery and clinical proteomics. *Trends Analyt Chem*. 2010;29(2):128.
9. Group. BDW. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2001;69(3):89-95.
10. Ahsan H. Biomolecules and biomarkers in oral cavity: bioassays and immunopathology. *J Immunoassay Immunochem*. 2019;40(1):52-69.
11. Bonassi S, Neri M, Puntoni R. Validation of biomarkers as early predictors of disease. *Mutat Res*. 2001;480-481:349-58.
12. Shah S. Salivaomics: The current scenario. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2018;22(3):375-81.
13. Tasoulas J, Patsouris E, Giaginis C, Theocharis S. Salivaomics for oral diseases biomarkers detection. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16(3):285-95.
14. Wong DT. Salivaomics. *J Am Dent Assoc*. 2012;143(10 Suppl):19S-24S.
15. Koneru S, Tanikonda R. Salivaomics - A promising future in early diagnosis of dental diseases. *Dent Res J (Isfahan)*. 2014;11(1):11-5.
16. Denzer K, Kleijmeer MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci*. 2000;113 Pt 19:3365-74.
17. Cheng J, Nonaka T, Wong DTW. Salivary Exosomes as Nanocarriers for Cancer Biomarker Delivery. *Materials (Basel)*. 2019;12(4).
18. Lakkaraju A, Rodriguez-Boulan E. Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol*. 2008;18(5):199-209.
19. Lässer C, Eldh M, Lötvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp*. 2012(59):e3037.

20. Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*. 2005;17(7):879-87.
21. Lasser C, Alikhani VS, Ekstrom K, Eldh M, Paredes PT, Bossios A, et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med*. 2011;9:9.
22. Conde-Vancells J, Falcon-Perez JM. Isolation of urinary exosomes from animal models to unravel noninvasive disease biomarkers. *Methods Mol Biol*. 2012;909:321-40.
23. Sheller-Miller S, Menon R. Isolation and characterization of human amniotic fluid-derived exosomes. *Methods Enzymol*. 2020;645:181-94.
24. Zlotogorski-Hurvitz A, Dayan D, Chaushu G, Korvala J, Salo T, Sormunen R, et al. Human saliva-derived exosomes: comparing methods of isolation. *J Histochem Cytochem*. 2015;63(3):181-9.
25. Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, et al. Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015;13(1):17-24.
26. Hemalatha A, Mayor S. Recent advances in clathrin-independent endocytosis. *F1000Res*. 2019;8.
27. Stein MP, Cao C, Tessema M, Feng Y, Romero E, Welford A, et al. Interaction and functional analyses of human VPS34/p150 phosphatidylinositol 3-kinase complex with Rab7. *Methods Enzymol*. 2005;403:628-49.
28. Soltész B, Buglyó G, Németh N, Szilágyi M, Pös O, Szemes T, et al. The Role of Exosomes in Cancer Progression. *Int J Mol Sci*. 2021;23(1).
29. McManaman JL, Reyland ME, Thrower EC. Secretion and fluid transport mechanisms in the mammary gland: comparisons with the exocrine pancreas and the salivary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2006;11(3-4):249-68.
30. Palanisamy V, Sharma S, Deshpande A, Zhou H, Gimzewski J, Wong DT. Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PLoS One*. 2010;5(1):e8577.
31. Ogawa Y, Taketomi Y, Murakami M, Tsujimoto M, Yanoshita R. Small RNA transcriptomes of two types of exosomes in human whole saliva determined by next generation sequencing. *Biol Pharm Bull*. 2013;36(1):66-75.
32. Ogawa Y, Miura Y, Harazono A, Kanai-Azuma M, Akimoto Y, Kawakami H, et al. Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(1):13-23.
33. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol*. 2012;10(12):e1001450.
34. Kim DK, Kang B, Kim OY, Choi DS, Lee J, Kim SR, et al. EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2013;2.
35. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):1535750.
36. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.

37. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-6.
38. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2016;1:15004.
39. Moreno-Moya JM, Vilella F, Simón C. MicroRNA: key gene expression regulators. *Fertil Steril*. 2014;101(6):1516-23.
40. Cortés-Sempere M, Ibáñez de Cáceres I. microRNAs as novel epigenetic biomarkers for human cancer. *Clin Transl Oncol*. 2011;13(6):357-62.
41. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004;23(20):4051-60.
42. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(12):1097-101.
43. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004;18(24):3016-27.
44. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303(5654):95-8.
45. Alarcón CR, Lee H, Goodarzi H, Halberg N, Tavazoie SF. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*. 2015;519(7544):482-5.
46. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004;10(2):185-91.
47. Zhang X, Liu F, Yang F, Meng Z, Zeng Y. Selectivity of Exportin 5 binding to human precursor microRNAs. *RNA Biol*. 2021;18(sup2):730-7.
48. Wilson RC, Tambe A, Kidwell MA, Noland CL, Schneider CP, Doudna JA. Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. *Mol Cell*. 2015;57(3):397-407.
49. Iwakawa HO, Tomari Y. Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. *Mol Cell*. 2022;82(1):30-43.
50. Kobayashi H, Tomari Y. RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1859(1):71-81.
51. Helwak A, Kudla G, Dudnakova T, Tollervey D. Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell*. 2013;153(3):654-65.
52. Zhong X, Coukos G, Zhang L. miRNAs in human cancer. *Methods Mol Biol*. 2012;822:295-306.
53. Gareev I, Beylerli O, Yang G, Sun J, Pavlov V, Izmailov A, et al. The current state of MiRNAs as biomarkers and therapeutic tools. *Clin Exp Med*. 2020.
54. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
55. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(11):857-66.

56. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):259-69.
57. Otmani K, Lewalle P. Tumor Suppressor miRNA in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment: Mechanism of Deregulation and Clinical Implications. *Front Oncol*. 2021;11:708765.
58. Pradhan AK, Emdad L, Das SK, Sarkar D, Fisher PB. The Enigma of miRNA Regulation in Cancer. *Adv Cancer Res*. 2017;135:25-52.
59. Li L, Yuan L, Luo J, Gao J, Guo J, Xie X. MiR-34a inhibits proliferation and migration of breast cancer through down-regulation of Bcl-2 and SIRT1. *Clin Exp Med*. 2013;13(2):109-17.
60. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(39):13944-9.
61. Calin GA, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik SE, Shimizu M, et al. MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(13):5166-71.
62. Pekarsky Y, Croce CM. Role of miR-15/16 in CLL. *Cell Death Differ*. 2015;22(1):6-11.
63. Liu D, Chen C, Cui M, Zhang H. miR-140-3p inhibits colorectal cancer progression and its liver metastasis by targeting BCL9 and BCL2. *Cancer Med*. 2021;10(10):3358-72.
64. Jiang W, Li T, Wang J, Jiao R, Shi X, Huang X, et al. miR-140-3p Suppresses Cell Growth And Induces Apoptosis In Colorectal Cancer By Targeting PD-L1. *Onco Targets Ther*. 2019;12:10275-85.
65. Chen J, Cai S, Gu T, Song F, Xue Y, Sun D. MiR-140-3p Impedes Gastric Cancer Progression and Metastasis by Regulating BCL2/BECN1-Mediated Autophagy. *Onco Targets Ther*. 2021;14:2879-92.
66. Babaei G, Raei N, Toofani Milani A, Gholizadeh-Ghaleh Aziz S, Pourjabbar N, Geravand F. The emerging role of miR-200 family in metastasis: focus on EMT, CSCs, angiogenesis, and anoikis. *Mol Biol Rep*. 2021;48(10):6935-47.
67. Cavallari I, Ciccarese F, Sharova E, Urso L, Raimondi V, Silic-Benussi M, et al. The miR-200 Family of microRNAs: Fine Tuners of Epithelial-Mesenchymal Transition and Circulating Cancer Biomarkers. *Cancers (Basel)*. 2021;13(23).
68. Bautista-Sánchez D, Arriaga-Canon C, Pedroza-Torres A, De La Rosa-Velázquez IA, González-Barrios R, Contreras-Espinosa L, et al. The Promising Role of miR-21 as a Cancer Biomarker and Its Importance in RNA-Based Therapeutics. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020;20:409-20.
69. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 2007;26(19):2799-803.
70. Masoudi MS, Mehrabian E, Mirzaei H. MiR-21: A key player in glioblastoma pathogenesis. *J Cell Biochem*. 2018;119(2):1285-90.
71. Dal Bo M, Bomben R, Hernández L, Gattei V. The MYC/miR-17-92 axis in lymphoproliferative disorders: A common pathway with therapeutic potential. *Oncotarget*. 2015;6(23):19381-92.
72. Zhang X, Li Y, Qi P, Ma Z. Biology of MiR-17-92 Cluster and Its Progress in Lung Cancer. *Int J Med Sci*. 2018;15(13):1443-8.

73. Jung YJ, Kim JW, Park SJ, Min BY, Jang ES, Kim NY, et al. c-Myc-mediated overexpression of miR-17-92 suppresses replication of hepatitis B virus in human hepatoma cells. *J Med Virol*. 2013;85(6):969-78.
74. Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One*. 2012;7(3):e30679.
75. Squadrito ML, Baer C, Burdet F, Maderna C, Gilfillan GD, Lyle R, et al. Endogenous RNAs modulate microRNA sorting to exosomes and transfer to acceptor cells. *Cell Rep*. 2014;8(5):1432-46.
76. Kosaka N, Iguchi H, Hagiwara K, Yoshioka Y, Takeshita F, Ochiya T. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *J Biol Chem*. 2013;288(15):10849-59.
77. Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, et al. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun*. 2013;4:2980.
78. Koppers-Lalic D, Hackenberg M, Bijnsdorp IV, van Eijndhoven MAJ, Sadek P, Sie D, et al. Nontemplated nucleotide additions distinguish the small RNA composition in cells from exosomes. *Cell Rep*. 2014;8(6):1649-58.
79. Guduric-Fuchs J, O'Connor A, Camp B, O'Neill CL, Medina RJ, Simpson DA. Selective extracellular vesicle-mediated export of an overlapping set of microRNAs from multiple cell types. *BMC Genomics*. 2012;13:357.
80. Rivera-Luna R, Correa-González C, Altamirano-Alvarez E, Sánchez-Zubieta F, Cárdenas-Cardós R, Escamilla-Asian G, et al. Incidence of childhood cancer among Mexican children registered under a public medical insurance program. *Int J Cancer*. 2013;132(7):1646-50.
81. Rivera-Luna R, Shalkow-Klincovstein J, Velasco-Hidalgo L, Cárdenas-Cardós R, Zapata-Tarrés M, Olaya-Vargas A, et al. Descriptive Epidemiology in Mexican children with cancer under an open national public health insurance program. *BMC Cancer*. 2014;14:790.
82. Xu JF, Wang YP, Zhang SJ, Chen Y, Gu HF, Dou XF, et al. Exosomes containing differential expression of microRNA and mRNA in osteosarcoma that can predict response to chemotherapy. *Oncotarget*. 2017;8(44):75968-78.
83. Yan W, Song L, Wang H, Yang W, Hu L, Yang Y. Extracellular vesicles carrying miRNA-181b-5p affects the malignant progression of acute lymphoblastic leukemia. *J Transl Med*. 2021;19(1):511.
84. Ghayad SE, Rammal G, Ghamloush F, Basma H, Nasr R, Diab-Assaf M, et al. Exosomes derived from embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma carry differential miRNA cargo and promote invasion of recipient fibroblasts. *Sci Rep*. 2016;6:37088.
85. Gong L, Bao Q, Hu C, Wang J, Zhou Q, Wei L, et al. Exosomal miR-675 from metastatic osteosarcoma promotes cell migration and invasion by targeting CALN1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;500(2):170-6.
86. Ventura S, Aryee DN, Felicetti F, De Feo A, Mancarella C, Manara MC, et al. CD99 regulates neural differentiation of Ewing sarcoma cells through miR-34a-Notch-mediated control of NF-κB signaling. *Oncogene*. 2016;35(30):3944-54.

87. Raimondi L, De Luca A, Gallo A, Costa V, Russelli G, Cuscino N, et al. Osteosarcoma cell-derived exosomes affect tumor microenvironment by specific packaging of microRNAs. *Carcinogenesis*. 2020;41(5):666-77.
88. Ravishankar H, Mangani AS, Phoebe Moses GL, Mani SP, Parameswaran S, Khetan V, et al. Serum exosomal miRNA as biomarkers for Retinoblastoma. *Exp Eye Res*. 2020;199:108184.
89. Haque S, Vaiselbuh SR. Silencing of Exosomal miR-181a Reverses Pediatric Acute Lymphocytic Leukemia Cell Proliferation. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020;13(9).
90. Zhao C, Du F, Zhao Y, Wang S, Qi L. Acute myeloid leukemia cells secrete microRNA-4532-containing exosomes to mediate normal hematopoiesis in hematopoietic stem cells by activating the LDOC1-dependent STAT3 signaling pathway. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):384.
91. Hornick NI, Huan J, Doron B, Goloviznina NA, Lapidus J, Chang BH, et al. Serum Exosome MicroRNA as a Minimally-Invasive Early Biomarker of AML. *Sci Rep*. 2015;5:11295.
92. Haug BH, Hald Ø, Utnes P, Roth SA, Løkke C, Flægstad T, et al. Exosome-like Extracellular Vesicles from MYCN-amplified Neuroblastoma Cells Contain Oncogenic miRNAs. *Anticancer Res*. 2015;35(5):2521-30.
93. Ma J, Xu M, Yin M, Hong J, Chen H, Gao Y, et al. Exosomal hsa-miR199a-3p Promotes Proliferation and Migration in Neuroblastoma. *Front Oncol*. 2019;9:459.
94. De Feo A, Sciandra M, Ferracin M, Felicetti F, Astolfi A, Pignochino Y, et al. Exosomes from CD99-deprived Ewing sarcoma cells reverse tumor malignancy by inhibiting cell migration and promoting neural differentiation. *Cell Death Dis*. 2019;10(7):471.
95. Túzesi Á, Kling T, Wenger A, Lunavat TR, Jang SC, Rydenhag B, et al. Pediatric brain tumor cells release exosomes with a miRNA repertoire that differs from exosomes secreted by normal cells. *Oncotarget*. 2017;8(52):90164-75.
96. Langevin S, Kuhnell D, Parry T, Biesiada J, Huang S, Wise-Draper T, et al. Comprehensive microRNA-sequencing of exosomes derived from head and neck carcinoma cells. *Oncotarget*. 2017;8(47):82459-74.
97. Machida T, Tomofuji T, Maruyama T, Yoneda T, Ekuni D, Azuma T, et al. miR-1246 and miR-4644 in salivary exosome as potential biomarkers for pancreatobiliary tract cancer. *Oncol Rep*. 2016;36(4):2375-81.
98. He L, Ping F, Fan Z, Zhang C, Deng M, Cheng B, et al. Salivary exosomal miR-24-3p serves as a potential detective biomarker for oral squamous cell carcinoma screening. *Biomed Pharmacother*. 2020;121:109553.
99. Nair S, Tang KD, Kenny L, Punyadeera C. Salivary exosomes as potential biomarkers in cancer. *Oral Oncol*. 2018;84:31-40.
100. Tang YT, Huang YY, Zheng L, Qin SH, Xu XP, An TX, et al. Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *Int J Mol Med*. 2017;40(3):834-44.
101. Melo SA, Esteller M. Disruption of microRNA nuclear transport in human cancer. *Semin Cancer Biol*. 2014;27:46-51.

102. Dard-Dascot C, Naquin D, d'Aubenton-Carafa Y, Alix K, Thermes C, van Dijk E. Systematic comparison of small RNA library preparation protocols for next-generation sequencing. *BMC Genomics*. 2018;19(1):118.
103. Goossens N, Nakagawa S, Sun X, Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl Cancer Res*. 2015;4(3):256-69.
104. Ou FS, Michiels S, Shyr Y, Adjei AA, Oberg AL. Biomarker Discovery and Validation: Statistical Considerations. *J Thorac Oncol*. 2021;16(4):537-45.
105. Han Y, Jia L, Zheng Y, Li W. Salivary Exosomes: Emerging Roles in Systemic Disease. *Int J Biol Sci*. 2018;14(6):633-43.
106. Sharma S, Gillespie BM, Palanisamy V, Gimzewski JK. Quantitative nanostructural and single-molecule force spectroscopy biomolecular analysis of human-saliva-derived exosomes. *Langmuir*. 2011;27(23):14394-400.
107. Li F, Kaczor-Urbanowicz KE, Sun J, Majem B, Lo HC, Kim Y, et al. Characterization of Human Salivary Extracellular RNA by Next-generation Sequencing. *Clin Chem*. 2018;64(7):1085-95.
108. Ahmad P, Slavik M, Trachtova K, Gablo NA, Kazda T, Gurin D, et al. Salivary microRNAs identified by small RNA sequencing as potential predictors of response to intensity-modulated radiotherapy in head and neck cancer patients. *Cell Oncol (Dordr)*. 2020;43(3):505-11.
109. Majem B, Li F, Sun J, Wong DT. RNA Sequencing Analysis of Salivary Extracellular RNA. *Methods Mol Biol*. 2017;1537:17-36.
110. Vigneault F, Ter-Ovanesyan D, Alon S, Eminaga S, Christodoulou D, Seidman JG, et al. High-throughput multiplex sequencing of miRNA. *Curr Protoc Hum Genet*. 2012;Chapter 11:Unit 11.2.1-0.
111. Olivares D, Perez-Hernandez J, Perez-Gil D, Chaves FJ, Redon J, Cortes R. Optimization of small RNA library preparation protocol from human urinary exosomes. *J Transl Med*. 2020;18(1):132.
112. Ziemann M, Kaspi A, El-Osta A. Evaluation of microRNA alignment techniques. *RNA (New York, NY)*. 2016;22(8):1120-38.
113. Tam S, Tsao M-S, McPherson JD. Optimization of miRNA-seq data preprocessing. *Briefings in bioinformatics*. 2015;16(6):950-63.
114. van Balkom BW, Eisele AS, Pegtel DM, Bervoets S, Verhaar MC. Quantitative and qualitative analysis of small RNAs in human endothelial cells and exosomes provides insights into localized RNA processing, degradation and sorting. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:26760.
115. Song J, Ouyang Y, Che J, Li X, Zhao Y, Yang K, et al. Potential Value of miR-221/222 as Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Biomarkers for Diseases. *Front Immunol*. 2017;8:56.
116. Zhao H, Guan J, Lee HM, Sui Y, He L, Siu JJ, et al. Up-regulated pancreatic tissue microRNA-375 associates with human type 2 diabetes through beta-cell deficit and islet amyloid deposition. *Pancreas*. 2010;39(6):843-6.
117. Wei J, Lu Y, Wang R, Xu X, Liu Q, He S, et al. MicroRNA-375: potential cancer suppressor and therapeutic drug. *Biosci Rep*. 2021;41(9).
118. Chen F, Wang N, Tan HY, Guo W, Zhang C, Feng Y. The functional roles of exosomes-derived long non-coding RNA in human cancer. *Cancer Biol Ther*. 2019;20(5):583-92.

119. Allen CE, Kelly KM, Bollard CM. Pediatric lymphomas and histiocytic disorders of childhood. *Pediatr Clin North Am.* 2015;62(1):139-65.
120. Pekarsky Y, Santanam U, Cimmino A, Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, et al. Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res.* 2006;66(24):11590-3.
121. Ciafrè SA, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu CG, Sabatino G, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;334(4):1351-8.
122. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2005;65(14):6029-33.
123. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 2005;65(16):7065-70.
124. Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, et al. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(32):11755-60.
125. Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res.* 2003;1(12):882-91.
126. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene.* 2006;25(17):2537-45.
127. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 2004;64(11):3753-6.
128. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 2005;65(21):9628-32.
129. Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(10):3627-32.
130. Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004;39(2):167-9.
131. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(52):19075-80.
132. Pallante P, Visone R, Ferracin M, Ferraro A, Berlingieri MT, Troncione G, et al. MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr Relat Cancer.* 2006;13(2):497-508.
133. Voorhoeve PM, le Sage C, Schrier M, Gillis AJ, Stoop H, Nagel R, et al. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Advances in experimental medicine and biology.* 2007;604:17-46.
134. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental biology.* 2007;302(1):1-12.
135. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Källér M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics.* 2016;32(19):3047-8.

136. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25(14):1754-60.
137. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. 2009;10(3):R25.
138. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*. 2012;9(4):357-9.
139. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-9.
140. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015;31(2):166-9.