



Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua / Grado en Bioquímica y Biología
Molecular

Identificación de marcadores genéticos asociados con la supervivencia en LLA pediátrica

Egilea/Autor/a:
Aizpea Artetxe Zurutuza

Zuzendaria/Director/a:
Idoia Martin Guerrero
Zuzendarikidea/Codirector/a:
Elixabet López López

© 2019, Aizpea Artetxe Zurutuza

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	1
<u>Leucemia Linfoblástica Aguda infantil</u>	1
<u>microRNAs como marcadores pronósticos</u>	2
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	4
<u>Hipótesis</u>	4
<u>Objetivos</u>	4
MATERIALES Y MÉTODOS	4
<u>Búsqueda sistemática en la literatura</u>	4
<u>Estudio de asociación de SNPs en miRNAs y supervivencia en LLA</u>	5
Pacientes.....	5
Selección de miRNAs y SNPs en miRNAs.....	5
Genotipado de los polimorfismos.....	5
Análisis estadístico.....	5
Predicción de la estructura secundaria de los miRNAs	6
Predicción de dianas de miRNAs	6
Análisis de rutas	6
RESULTADOS	6
<u>Búsqueda sistemática</u>	6
<u>Estudio de asociación de SNPs en miRNAs y supervivencia en LLA</u>	7
Características de los pacientes.....	7
Resultados del genotipado	7
Variables de confusión	8
<u>Estudio de asociación de SNPs en miRNAs y supervivencia en LLA infantil</u>	8
<u>Predicción de la estructura secundaria de miRNAs</u>	10
<u>Predicción de genes diana y análisis de rutas</u>	11
DISCUSIÓN	12
CONCLUSIONES	14
BIBLIOGRAFÍA	14

RESUMEN

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es una neoplasia de los precursores linfoides que representa casi un tercio de todos los casos de cáncer pediátrico. Pese a que las tasas de supervivencia han mejorado durante las últimas décadas, sigue habiendo pacientes que muestran resistencia, por lo que definir nuevos marcadores pronósticos sería de gran interés para mejorar la supervivencia.

En este contexto, se ha visto que los microRNAs (miRNAs) podrían ser marcadores potenciales ya que regulan más del 50% de nuestros genes y se han descrito asociaciones entre la expresión de algunos miRNAs y el pronóstico de la LLA. Teniendo en cuenta que polimorfismos genéticos en los miRNAs podrían tener un impacto tanto en sus niveles como en su función, el objetivo de este estudio es identificar nuevos marcadores pronósticos en LLA-B, mediante el estudio de SNPs en miRNAs.

Para llevar a cabo este estudio, se realizó tanto una búsqueda sistemática de la literatura como un estudio de asociación, en el que se incluyeron 167 pacientes con LLA-B y se analizaron 160 SNPs en miRNAs para determinar su asociación con la supervivencia.

De este modo, no se encontró ningún artículo que analizara el efecto de SNPs en miRNAs en la supervivencia de los pacientes con LLA. En cambio, en el estudio de asociación, se identificaron 3 SNPs en miRNAs (rs17797090 en hsa-mir-3652, rs28645567 en hsa-mir-378d-1 y rs74469188 en hsa-mir-6504) asociados significativamente con la supervivencia libre de enfermedad o la supervivencia global después de realizar la corrección de Bonferroni. Al analizar el posible efecto funcional de estos SNPs mediante herramientas de predicción *in silico*, se observó que podrían cambiar la estabilidad del pre-miRNA, lo que podrían afectar a la regulación de sus genes diana predichos en las vías de señalización de Ras y mTOR.

Esto apunta a que los SNPs en miRNAs podrían ser de utilidad para predecir la respuesta al tratamiento en niños con LLA-B.

INTRODUCCIÓN

Leucemia Linfoblástica Aguda infantil

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es una neoplasia de los precursores linfoides, los linfoblastos, que puede afectar a las células B o a las T. La adquisición de una serie de aberraciones genéticas altera la maduración normal de estas células, deteniendo el proceso de diferenciación y llevando a una proliferación anormal. Como consecuencia, las células leucémicas se acumulan tanto en la médula ósea, donde suprimen la hematopoyesis fisiológica, como en sitios extramedulares (Chiaretti et al., 2014).

La mayoría de los casos de LLA se dan en niños, y representa casi un tercio de todos los casos de cáncer pediátrico. La incidencia mundial es de 1-4,75/100.000 casos al año, estando el pico de incidencia entre

los 2 y 5 años. En España, de acuerdo con el Registro Nacional de Tumores Infantiles (RETI-SEHOP, 1980-2016), la LLA tiene una incidencia en menores de 14 años del 37,1% de todas las neoplasias pediátricas. Además, la LLA es más común en varones que en mujeres, y también se han descrito diferencias raciales y étnicas tanto en incidencia como en respuesta al tratamiento (Lim et al., 2014). El 80-85% de todos los casos de LLA tienen su origen en los precursores de las células B, y el 20-25% en las células T (Chiaretti et al., 2014). Así pues, de ahora en adelante nos centraremos en la Leucemia Linfoblástica Aguda de los precursores de las células B (LLA-B).

Durante las últimas décadas, las tasas de supervivencia de esta patología han aumentado considerablemente hasta conseguir valores de hasta el 90%, gracias, en parte, al desarrollo de protocolos de tratamiento estratificados en función del riesgo de cada paciente (Pui et al., 2015). El grupo de riesgo se define en base a biomarcadores que incluyen biomarcadores genéticos, tales como mutaciones, translocaciones y aneuploidías con probado valor pronóstico (Moorman, 2016). Una vez definido el grupo de riesgo, en función del mismo, se administra un tratamiento más o menos intensivo, el cual consiste en una combinación de múltiples fármacos que se administran en distintas fases. En una primera fase, se hace una inducción para recuperar la hematopoyesis normal. Después, se realiza una fase de consolidación para prevenir la formación de clones resistentes a la terapia. Finalmente, mediante la fase de mantenimiento, se pretende preservar la remisión (Kato & Manabe, 2018). Los pacientes de alto riesgo, además, reciben una fase de intensificación antes del mantenimiento y/o trasplante de células hematopoyéticas.

Sin embargo, a pesar de los grandes avances conseguidos, sigue habiendo pacientes que muestran resistencia. Teniendo esto en cuenta, la descripción de nuevos biomarcadores con valor pronóstico podría ser de gran interés para mejorar la supervivencia de estos pacientes.

microRNAs como marcadores pronósticos

Los microRNAs (miRNA) son RNAs no codificantes de una cadena de 21-23 nucleótidos de longitud cuya función es regular la expresión de genes a nivel post-transcripcional. Para ello, se unen a una secuencia específica de la región 3'-UTR de sus múltiples mRNA dianas, llevando a su degradación o supresión de la traducción.

Los genes de miRNAs se transcriben mediante la RNA polimerasa II en miRNAs primarios (pri-miRNA) de unos 500-3.000 pb de largo. Estos pri-miRNAs son procesados por Drosha para formar el miRNA precursor (pre-miRNA), de 60-70 nucleótidos, que es transportado del núcleo al citoplasma mediante la Exportina-5 (XPO5). Una vez en el citoplasma, la ribonucleasa III Dicer lo procesa para crear dos moléculas de RNA complementarias cortas. A continuación, cada RNA es incorporado al complejo RISC (*miRNA-mRNA-induced silencing complex*). Esto lleva a la activación de dicho complejo, que se une a la región 3'-UTR del mRNA diana y contribuye así a la regulación de la expresión del gen (Guo et al., 2016) (**Figura 1**).

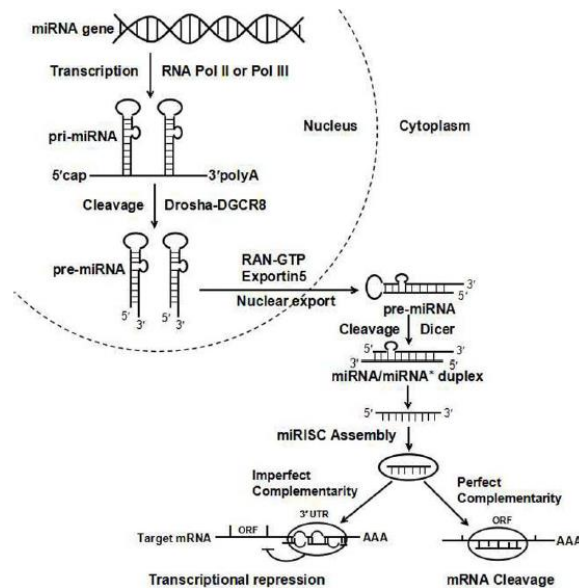


Figura 1. Representación esquemática de la biogénesis y el mecanismo de acción de los miRNAs (Li et al., 2016).

La unión del complejo RISC al mRNA está mediada por una secuencia de 2-8 nucleótidos denominada región semilla (Armand-Labit & Pradines, 2017). De este modo, la regulación de la expresión genética dependerá de la complementariedad entre el miRNA y mRNA. Así, en el caso de que la complementariedad sea perfecta, el mRNA es degradado, mientras que si es parcial esto llevará al silenciamiento del gen (Afonso-Grunz & Müller, 2015). Además, un mismo miRNA puede tener más de una diana, del mismo modo que un mRNA puede ser regulado por más de un miRNA (Armand-Labit & Pradines, 2017).

Mediante el mecanismo descrito, los miRNAs juegan un papel importante en la regulación de un gran número de procesos biológicos y enfermedades e incluso pueden funcionar como oncogenes o como supresores de tumores (Swellam & El-Khazragy, 2016). En el caso de la leucemia linfoblástica aguda infantil, ya se han descrito algunos ejemplos en los que se ha visto que cambios en la expresión de algunos miRNAs están asociados con el pronóstico (Gutierrez-Camino et al., 2019). Dichos cambios de expresión podrían estar mediados por la presencia de variantes genéticas, como los polimorfismos de un único nucleótido (SNPs).

Los SNPs en genes de miRNA podrían tener un efecto sobre la función de los miRNAs mediante tres mecanismos distintos: alterando los niveles de expresión del transcrito primario, el procesamiento de pri-miRNA y pre-miRNA o afectando a las interacciones entre miRNA y mRNA. Como resultado, pueden afectar a los niveles de miRNA maduro y/o a la selección de genes diana, lo que puede llevar a una expresión alterada de genes involucrados en distintos procesos biológicos relevantes en LLA (Guo et al., 2016).

En este contexto, en este trabajo se pretende evaluar el papel de los SNPs en miRNAs en la supervivencia de los pacientes de LLA-B pediátrica.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Dado que el uso de biomarcadores genéticos ha mejorado la supervivencia en pacientes con LLA-B infantil, que existen evidencias que muestran que los miRNAs juegan un papel importante en la LLA y que los SNPs en los genes de los miRNAs pueden afectar a su función, la hipótesis planteada en este trabajo es que los SNPs en miRNAs están asociados con la supervivencia en LLA-B infantil y pueden tener, por tanto, valor como biomarcadores pronósticos.

Objetivos

El objetivo de este estudio es identificar nuevos marcadores pronósticos en LLA-B, mediante el estudio de SNPs en miRNAs. Para alcanzar este objetivo general, los objetivos específicos del proyecto son los siguientes:

- Identificar todos los trabajos que hayan estudiado polimorfismos en miRNAs asociados con la supervivencia en LLA-B pediátrica mediante una búsqueda sistemática de la literatura.
- Identificar SNPs en miRNAs asociados con la supervivencia en una población de LLA-B llevando a cabo un estudio de asociación.
- Determinar el efecto funcional de los SNPs y las rutas diana de dichos miRNAs mediante un análisis *in silico*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Búsqueda sistemática en la literatura

Se realizó una búsqueda sistemática en la base de datos Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) con el objetivo de encontrar los estudios publicados en la literatura que analizaran variantes genéticas en miRNAs asociadas con la supervivencia y, por tanto, con un posible valor pronóstico, en LLA infantil. Para ello, se utilizaron las siguientes palabras clave: (polymorphism OR polymorphisms OR variant OR variants OR snp OR snps) AND (acute lymphoblastic leukemia OR acute lymphoblastic leukaemia OR acute lymphocytic leukemia OR acute lymphocytic leukaemia) AND (survival OR outcome OR response OR prognostic OR prognosis) AND (microrna OR mirna OR non coding rna OR miR). La búsqueda se realizó en septiembre de 2018.

Los artículos obtenidos en la búsqueda fueron revisados uno a uno para incluir sólo aquellos estudios que se realizaron en pacientes pediátricos de LLA y que presentaban datos independientes analizando variantes genéticas en miRNAs asociadas con la supervivencia.

Mediante la lectura de los resúmenes y/o textos completos, las revisiones, los artículos que no estaban en inglés, los artículos que no estudiaban miRNAs o SNPs, así como los que trataban de otras

enfermedades que no fueran LLA y los que no se centraban en el estudio de la supervivencia fueron excluidos.

Estudio de asociación de SNPs en miRNAs y supervivencia en LLA

Pacientes

Este estudio incluyó un total de 186 pacientes con LLA-B diagnosticados entre 1996 y 2014 en 5 hospitales españoles (Hospital Universitario de Cruces, Hospital Universitario de Donostia, Hospital Universitario La Paz, Hospital Universitario Miguel Servet y Hospital Universitario Vall d'Hebrón). Los pacientes fueron tratados de forma homogénea con los protocolos SHOP 2005, 94, 99 o LAL SEHOP-PETHEMA 2013, en función de la versión vigente en el momento de su diagnóstico.

Selección de miRNAs y SNPs en miRNAs

En este estudio, se seleccionaron todos los SNPs en pre-miRNAs que estuvieran descritos en las bases de datos con una MAF superior al 1 % ($MAF \geq 0,01$) en poblaciones europeas/caucásicas hasta mayo de 2014. La razón por la que se decidió incluir todos los miRNAs es que cada miRNA puede regular un amplio rango de genes, y por lo tanto, cualquiera podría estar implicado en la regulación de los genes que afectan a la supervivencia de LLA. La selección de SNPs se realizó utilizando la base de datos miRNA SNiPer (www.integratomics-time.com/miRNA-SNiPer/) y la base de datos dbSNP del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). De este modo, se incluyeron un total de 213 SNPs en 206 pre-miRNAs.

Genotipado de los polimorfismos

El DNA genómico fue extraído de muestras de sangre periférica o médula ósea de pacientes de LLA en remisión completa (<5% blastos en médula ósea). El DNA fue cuantificado utilizando PicoGreen (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Por cada muestra, fueron genotipados 400 ng de DNA utilizando el GoldenGate Genotyping Assay con la tecnología Veracode de acuerdo con el protocolo de Illumina. Esta plataforma permite un ensayo múltiple de PCR, lo que significa que es posible procesar un gran número de SNPs de manera simultánea. Para la interpretación de los datos del genotipado, se empleó el software GenomeStudio. Aquellos SNPs monomórficos o con fallos de genotipado fueron eliminados de posteriores análisis.

Análisis estadístico

Para determinar si la edad, el sexo, el protocolo de tratamiento y el grupo de riesgo podían ser variables de confusión, se analizó la asociación entre la supervivencia y cada una de dichas variables. La posible asociación entre el pronóstico y la edad se evaluó mediante el t-test, mientras que en el caso del sexo se empleó el test de Fisher. Para el protocolo de tratamiento y el grupo de riesgo, por su parte, se realizó un análisis de regresión lineal.

El análisis de la asociación entre los SNPs en miRNAs y la supervivencia a los 5 años, tanto supervivencia libre de enfermedad (SLE) como supervivencia global (SG), se llevó a cabo mediante un análisis de regresión lineal. Se seleccionaron los modelos genéticos más significativos entre los test codominante, dominante y recesivo, para determinar la significación estadística de cada SNP. Una vez obtenidos los SNPs significativos, se realizó una corrección de los p-valores mediante el método de Bonferroni.

Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el software R 3.5.1. En todos los casos, el nivel de significación se estableció en 5%.

Predicción de la estructura secundaria de los miRNAs

Se utilizó la base de datos miRNA SNP 2.0 (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/miRNASNP2/>) para determinar el efecto funcional de los SNPs asociados significativamente con la supervivencia en la estructura secundaria y el cambio de energía ($\Delta\Delta G$).

Predicción de dianas de miRNAs

Para seleccionar los genes diana de los miRNAs se utilizó la base de datos MiRWalk (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>), que aglutina información de las siguientes bases de datos: mirWalk, miRDB, PITA, MicroT4, miRMap, RNA22, miRanda, miRNAMap, RNAhybrid, miRBridge, PICTAR2 y Targetscan. Así pues, se seleccionaron los genes diana predichos por al menos 6 de dichas bases de datos.

Análisis de rutas

El análisis de las rutas enriquecidas se realizó teniendo en cuenta los genes diana predichos para cada miRNA, utilizando el módulo “*over-representation analysis*” de la base de datos ConsensusPathDB (CPdB) (<http://consensuspathdb.org/>).

RESULTADOS

Búsqueda sistemática

En la búsqueda sistemática realizada en la base de datos Pubmed, se obtuvieron un total de 29 artículos. De todos esos artículos, 22 fueron descartados tras la lectura del resumen, ya que no cumplían los criterios de inclusión establecidos. Tras la lectura del texto completo de los 7 artículos restantes, todos ellos fueron excluidos porque no estaban disponibles en inglés, no estudiaban SNPs en miRNAs o porque no se centraban en la supervivencia, sino que trataban de la susceptibilidad o la toxicidad (**Figura 2**).

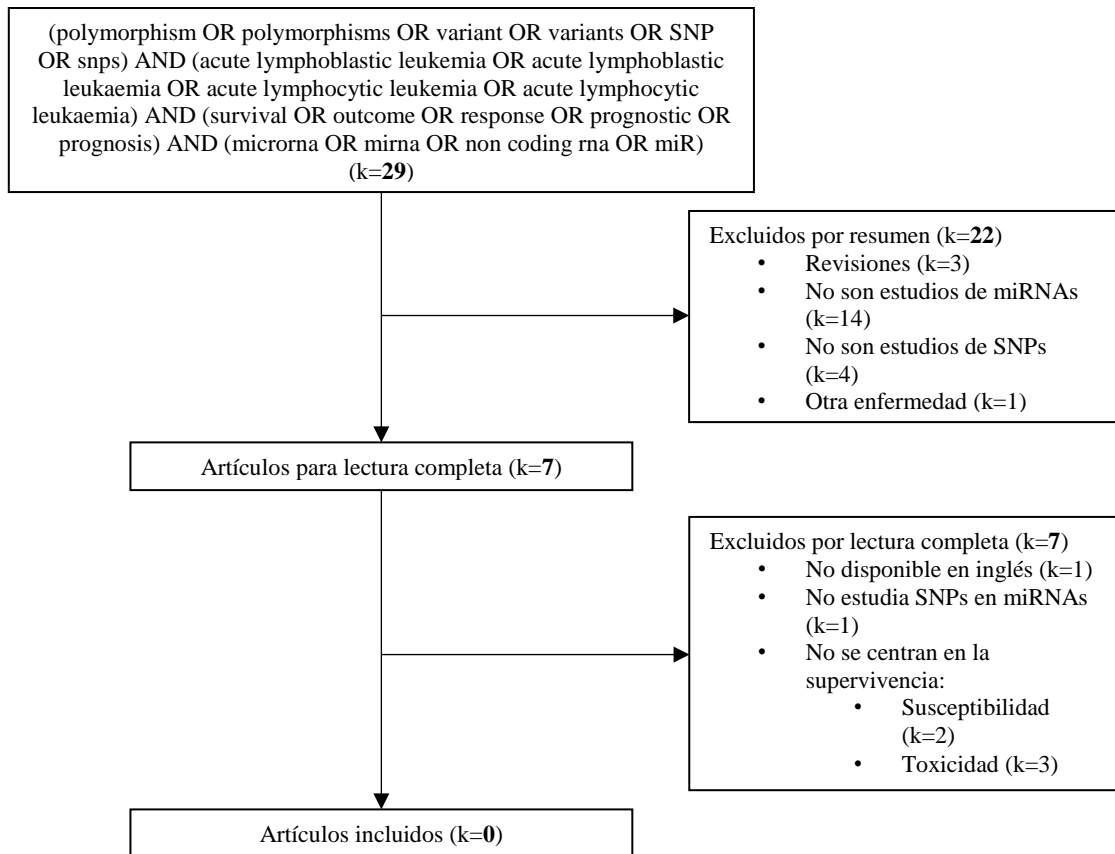


Figura 2. Diagrama de flujo que indica el proceso de inclusión y exclusión de artículos en la revisión sistemática.

Estudio de asociación de SNPs en miRNAs y supervivencia en LLA

Características de los pacientes

Este estudio se realizó con un total de 186 pacientes con LLA-B, entre los cuales 19 presentaron fallos de genotipado y fueron excluidos del estudio. Por lo tanto, el número final de pacientes incluidos en el estudio fue de 167, suponiendo un éxito de genotipado del 89,8%.

Resultados del genotipado

En cada uno de los pacientes, se analizaron 213 SNPs en miRNAs, de los que 53 fueron eliminados por presentar un porcentaje de genotipado < 80% o ser SNPs monomórficos. Finalmente, un total de 160 SNPs (75,1%) fueron incluidos en el análisis de asociación (**Tabla 1**).

Tabla 1. Características de los pacientes de LLA-B incluidos en el estudio.

Número de pacientes, n	167
Sexo, n (%)	
Hombres	93 (55,69)
Mujeres	74 (44,31)
Media de edad ± error estándar (años)	5,16 ± 0,26
Protocolo de tratamiento, n (%)	
SHOP 94	49 (29,34)

SHOP 99	14 (8,39)
SHOP 2005	98 (58,68)
LAL SEHOP-PETHEMA 2013	6 (3,59)
<hr/>	
Grupo de riesgo, n (%)	
Estándar	65 (38,92)
Alto	74 (44,31)
Muy alto	26 (15,57)
No se tienen datos	2 (1,20)

Variables de confusión

No se encontró asociación entre la supervivencia, SLE y SG, y la edad ($p = 0,8559$ y $p = 0,4341$, respectivamente), sexo ($p = 0,1018$ y $p = 0,07954$, respectivamente) o el protocolo de tratamiento ($p = 0,4469$ y $p = 0,8099$, respectivamente). En cambio, sí que se encontró asociación entre el grupo de riesgo y la supervivencia, tanto con la SLE como con la SG ($p = 0,0133$ y $p = 0,0142$).

Estudio de asociación de SNPs en miRNAs y supervivencia en LLA infantil

Se analizó la posible asociación entre los 160 SNPs en miRNAs incluidos en el estudio y la supervivencia (SLE y SG) a los 5 años en pacientes con LLA-B. En el caso de la SLE, 12 de los SNPs analizados estaban significativamente asociados con este parámetro. Además, tras la corrección por el grupo de riesgo todos ellos siguieron estando asociados significativamente (**Tabla 2**).

Tabla 2. SNPs en miRNAs asociados con la SLE de LLA-B.

SNP	miRNA	Localización	Genotipo	Sin recaída, n (%)	Recaída, n (%)	Modelo, p-valor	p-valor, (corregido)
rs17797090	mir-3652	pre-miRNA	GG	114 (80,28)	18 (78,26)	Codominante, 4×10^{-9}	2×10^{-9} * ($3,2 \times 10^{-7}$)
			AG	28 (19,72)	4 (17,39)		
			AA	0 (0)	1 (4,35)		
rs28645567	mir-378d-1	pre-miRNA	GG	140 (97,90)	20 (86,96)	Codominante, 0,0023	0,0010
			AG	3 (2,10)	3 (13,04)		
rs7227168	mir-4741	seed	CC	113 (79,58)	16 (72,73)	Recesivo, 0,0041	0,0015
			CT	27 (19,01)	4 (18,18)		
			TT	2 (1,41)	2 (9,09)		

p-valor: valor obtenido al realizar el análisis de regresión lineal entre cada uno de los SNPs y la SLE. En la tabla se muestran únicamente aquellos SNPs con $p < 0,01$.

p-valor corregido: corresponde al valor obtenido al incluir el grupo de riesgo en el análisis.

* SNP significativo después de la corrección de Bonferroni, el valor de p después de la corrección se muestra entre paréntesis.

Al realizar la corrección con el método Bonferroni, rs17797090 en hsa-mir-3652 ($p = 3,2 \times 10^{-7}$) se mantuvo como significativo. Los pacientes heterocigotos con un alelo A muestran una SLE similar a aquellos que son homocigotos para el alelo G, mientras que la SLE es menor en pacientes homocigotos para el alelo A (**Figura 3**).

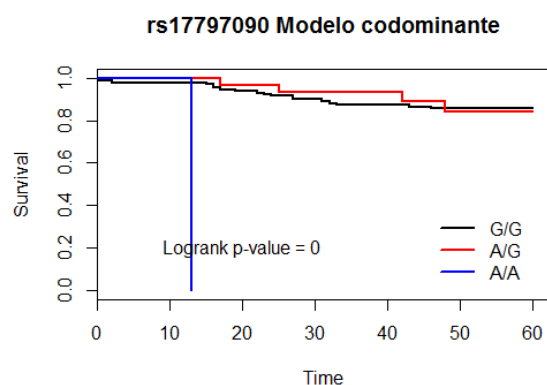


Figura 3. Curva de recaída para el SNP rs17797090, donde se observa que los pacientes homocigotos para el alelo A muestran un riesgo mayor de sufrir una recaída.

En cuanto a la SG, se encontraron un total de 11 SNPs asociados significativamente; y en este caso también estaban significativamente asociados tras la corrección por el grupo de riesgo (**Tabla 3**).

Tabla 3. SNPs en miRNAs asociados con la SG de LLA-B.

SNP	miRNA	Localización	Genotipo	Vivos, n (%)	Fallecidos, n (%)	Modelo, p-valor	p-valor, (corregido)
rs28645567	mir-378d-1	pre-miRNA	GG	155 (98,10)	5 (62,50)	Codominante, 7x10 ⁻⁹	3x10 ⁻⁸ * (4,8x10 ⁻⁶)
			AG	3 (1,90)	3 (37,50)		
rs74469188	mir-6504	maduro	TT	109 (78,42)	4 (66,66)	Recesivo, 0,0001	7x10 ⁻⁶ * (1,12x10 ⁻³)
			CT	29 (20,86)	1 (16,67)		
			CC	1 (0,72)	1 (16,67)		
rs2682818	mir-618	pre-miRNA	CC	125 (79,62)	3 (42,86)	Recesivo, 0,0008	0,0008
			AC	31 (19,74)	3 (42,86)		
			AA	1 (0,64)	1 (14,28)		
rs4919510	mir-608	maduro	CC	100 (63,70)	5 (62,50)	Recesivo, 0,0040	0,0012
			CG	51 (32,48)	1 (12,50)		
			GG	6 (3,82)	2 (25,00)		
rs12512664	mir-4274	pre-miRNA	AA	47 (29,75)	1 (14,29)	Recesivo, 0,0047	0,0011
			AG	72 (45,57)	1 (14,29)		
			GG	39 (24,68)	5 (71,42)		

p-valor: valor obtenido al realizar el análisis de regresión lineal entre cada uno de los SNPs y la SG. En la tabla se muestran únicamente aquellos SNPs con $p < 0,01$.

p-valor corregido: valor obtenido al incluir el grupo de riesgo en el análisis.

* SNP significativo después de la corrección de Bonferroni, el valor de p después de la corrección se muestra entre paréntesis.

Tras la corrección por el método Bonferroni, por su parte, se mantuvieron como significativos rs28645567 en hsa-mir-378d-1 y rs74469188 en hsa-mir-6504.

Entre ellos, el más significativo fue rs28645567 en hsa-mir-378d-1; con un p-valor de $4,8 \times 10^{-6}$ tras la corrección por el método Bonferroni. En esta ocasión, se observa un descenso en la SG en aquellos pacientes con un alelo A (**Figura 4**). Además, si se analiza el mismo SNP para el caso de la SLE, se observa que también está significativamente asociado bajo el modelo codominante ($p = 0,0023$); aunque

tras la corrección por el método Bonferroni no se mantiene como tal. Esto apoyaría la importancia de este polimorfismo en el pronóstico.

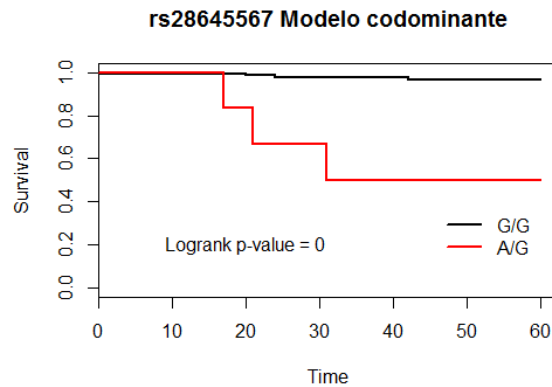


Figura 4. Curva de supervivencia para el SNP rs28645567, donde se observa que el alelo A aumenta el riesgo de fallecimiento.

En cuanto a rs74469188 en hsa-mir-6504, este SNP también se mantuvo como significativo tras la corrección por el método Bonferroni, obteniendo un p-valor de $1,12 \times 10^{-3}$. En este caso, el SNP es significativo bajo un modelo recesivo; de modo que aquellos pacientes homocigotos para el alelo C muestran un mayor riesgo de fallecimiento en comparación con los heterocigotos o los homocigotos para el alelo T (**Figura 5**). Además, en este caso también se observó una asociación en la SLE, pese a que tras la corrección por el método Bonferroni no se mantuvo como significativo.

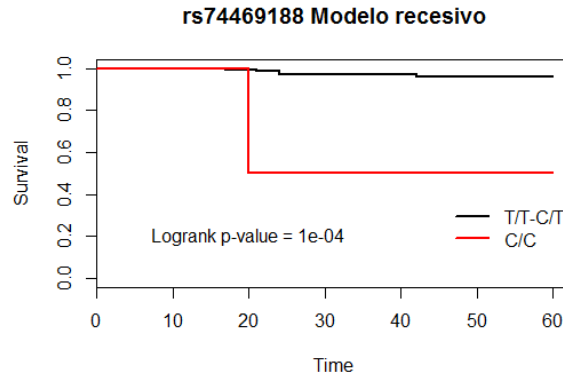


Figura 5. Curva de supervivencia para el SNP rs74469188, donde se observa que los homocigotos para el alelo C muestran un riesgo mayor de fallecimiento.

Predicción de la estructura secundaria de miRNAs

El análisis del cambio de la estructura secundaria y el cambio de la energía ($\Delta\Delta G$) se realizó únicamente con los SNPs que se mantuvieron como significativos tras la corrección por el método Bonferroni. En el caso de rs17797090 en hsa-mir-3652, la sustitución del alelo G por un alelo A induce tanto un cambio de energía de 4,1 kcal/mol (de -59,2 a -55,1 kcal/mol) como una modificación en la estructura secundaria (**Figura 6A**).

En rs28645567 en hsa-mir-378d-1, por su parte, la sustitución del alelo C por un alelo U induce un cambio de energía de 2,7 kcal/mol (de -20,3 a -17,6 kcal/mol), sin modificar la estructura secundaria (**Figura 6B**).

Por último, en el caso de rs74469188 en hsa-mir-6504, la sustitución del alelo U por el alelo C promueve un cambio de energía de 4,6 kcal/mol (de -37,4 a -32,8 kcal/mol), así como un cambio en la estructura secundaria (**Figura 6C**).

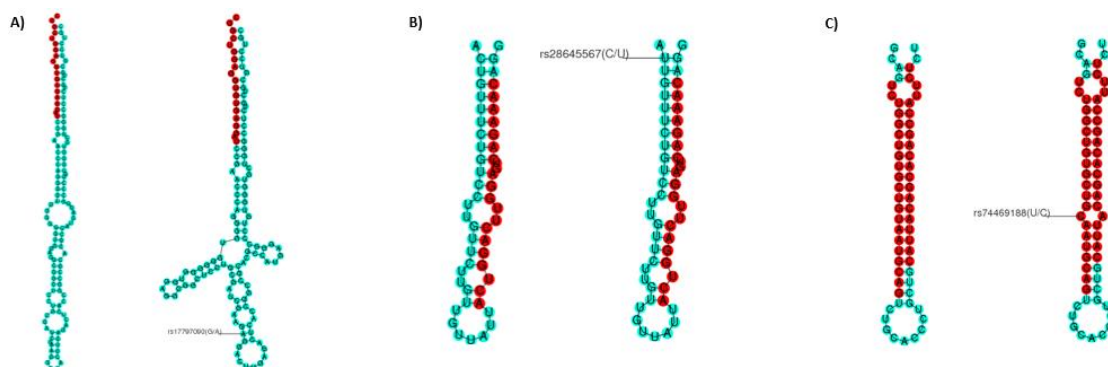


Figura 6. A) Estructura secundaria del miRNA hsa-mir-3652 con el alelo G (izquierda) y con el alelo A (derecha). El cambio de una G por una A promueve un cambio en la estructura. B) Estructura secundaria del miRNA hsa-mir-378d-1 con el alelo C (izquierda) y con el alelo U (derecha). El cambio de una C por una U no tiene influencia en la estructura. C) Estructura secundaria del miRNA hsa-mir-6504 con el alelo U (izquierda) y con el alelo C (derecha). El cambio de una U por una C promueve un cambio en la estructura secundaria.

Predicción de genes diana y análisis de rutas

Después de obtener los genes diana predichos por al menos 6 de las 12 bases de datos proporcionadas por mirWalk para hsa-mir-3652, hsa-mir-378d-1 y hsa-mir-6504, se realizó el análisis de las rutas significativamente enriquecidas. Así pues, se seleccionaron las 5 rutas más significativas para cada caso.

En el miRNA hsa-mir-3652, se obtuvieron un total de 372 rutas enriquecidas. Las 5 más significativas se presentan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Rutas metabólicas enriquecidas a partir de los genes diana predichos para hsa-mir-3652.

Nombre de la ruta	Número de genes de la ruta	Cobertura de la ruta (%)	p-valor	FDR	Base de datos
Guía axonal – Homo sapiens	175	42 (24,0)	$3,2 \times 10^{-9}$	$8,18 \times 10^{-6}$	KEGG
Vía de señalización de la hormona tiroidea – Homo sapiens	116	30 (25,9)	$9,61 \times 10^{-8}$	0,000123	KEGG
Vías de señalización en glioblastoma	83	24 (28,9)	$1,93 \times 10^{-7}$	0,000165	Wikipathways
Señalización Ras	184	38 (20,7)	$1,12 \times 10^{-6}$	0,000668	Wikipathways
Transporte de moléculas pequeñas	666	97 (14,6)	$1,41 \times 10^{-6}$	0,000668	Reactome

Una de las rutas metabólicas enriquecidas más significativas es la vía de señalización de Ras ($p = 0,000668$). En este caso se observó que 38 de los 184 genes que componen la ruta eran posibles dianas del miRNA hsa-mir-3652.

En cuanto al miRNA hsa-mir-378d-1, se encontraron 151 rutas enriquecidas, presentándose las 5 más significativas en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Rutas metabólicas enriquecidas a partir de los genes diana predichos para hsa-mir-378d-1.

Nombre de la ruta	Número de genes de la ruta	Cobertura de la ruta (%)	p-valor	FDR	Base de datos
Señalización de insulina	160	15 (9,4)	$4,77 \times 10^{-6}$	0,0046	Wikipathways
Regulación transcripcional por RUNX2	75	10 (13,3)	$8,64 \times 10^{-6}$	0,0046	Reactome
Vía de señalización de mTOR – Homo sapiens	151	14 (9,3)	$1,04 \times 10^{-5}$	0,0046	KEGG
Vías en cáncer – Homo sapiens	526	29 (5,5)	$1,46 \times 10^{-5}$	0,00474	KEGG
Vía de señalización TSH	66	9 (13,6)	$2,03 \times 10^{-5}$	0,00474	Wikipathways

Dos de las rutas más significativas fueron la vía de señalización de mTOR y vías en cáncer; con un p-valor de $1,04 \times 10^{-5}$ y $1,46 \times 10^{-5}$, respectivamente. En el caso de la vía de mTOR, se observó que 14 de los 151 genes que componen la ruta eran posibles dianas de este miRNA.

Para terminar, en el caso del miRNA hsa-mir-6504, ninguno de los genes diana obtenidos fue predicho por 6 o más bases de datos proporcionadas por mirWalk. Por ello, y considerando que la fiabilidad de los genes diana predichos por menos bases de datos es escasa, no se realizó el análisis de rutas enriquecidas.

DISCUSIÓN

Con el fin de identificar nuevos marcadores pronósticos en LLA-B, en este trabajo se estudió la asociación entre SNPs en miRNAs y la supervivencia en LLA-B pediátrica. Con este objetivo, se llevó a cabo una búsqueda sistemática en la literatura y un estudio de asociación.

En la búsqueda sistemática, aunque en un primer momento se identificaron 29 artículos con los parámetros de búsqueda empleados, tras la revisión de sus resúmenes y/o el artículo completo, se observó que ninguno de ellos estudiaba la asociación entre SNPs en miRNAs y la supervivencia en LLA. Esto apoya la necesidad de realizar un estudio en esta área, ya que ello podría ayudar a definir marcadores genéticos con valor pronóstico y a mejorar así la supervivencia de los pacientes.

En el estudio de asociación llevado a cabo, por su parte, se analizaron un total de 160 SNPs en miRNAs en una población de 167 pacientes. Los resultados obtenidos mostraron que 12 de los SNPs analizados

estaban significativamente asociados con la SLE, mientras que el número de SNPs asociados con la SG fue de 11. Además, se realizó una corrección incluyendo el grupo de riesgo, puesto que se definió que se trataba de una variable de confusión. De esta manera, todos los SNPs descritos como significativamente asociados se mantuvieron como tales tras la corrección. Estos SNPs podrían ser marcadores pronósticos potenciales.

Para aquellos SNPs que, además, se mantuvieron como significativos tras la corrección por el método Bonferroni, rs17797090 para la SLE y rs28645567 y rs74469188 para la SG, se llevó a cabo un estudio *in silico* para determinar su posible efecto funcional.

En el caso de rs17797090 en hsa-mir-3652, los pacientes homocigotos para el alelo A mostraban un mayor riesgo de sufrir una recaída. El análisis *in silico* determinó que el cambio del alelo G por el alelo A inducía un cambio de la estructura secundaria y un cambio de energía positivo, lo que puede hacer que el miRNA pase de un estado estable a uno inestable (Soemedi et al., 2017). Así pues, se ha propuesto que la reducción de la estabilidad estructural puede reducir la cantidad final del miRNA maduro (Gong et al., 2012). Dicha disminución en los niveles de miRNA llevaría a que sus genes diana se expresaran más.

Entre las rutas metabólicas enriquecidas obtenidas a partir de los genes diana predichos de hsa-mir-3652 se encuentra la vía de señalización de Ras. Se trata de una vía que regula numerosas funciones incluyendo la proliferación, supervivencia y migración celular, y que se ha visto que está desregulada en pacientes que han sufrido una recaída en LLA (Irving, 2016). Por ello, el aumento de la expresión de esta vía debido a la presencia del genotipo AA podría aumentar el riesgo de sufrir una recaída. En cualquier caso, teniendo en cuenta que el número de pacientes con genotipo AA era pequeño, habría que validar estos resultados en otras poblaciones para poder confirmar su valor pronóstico.

En cuanto al SNP rs28645567 en el miRNA hsa-mir-378d-1, se observó que la supervivencia global descendía en los pacientes con un alelo A con respecto a los homocigotos para el alelo G. Además, había una asociación significativa no solo para la SG, sino también para la SLE; lo que reforzaría los resultados obtenidos. Este SNP se encuentra en el pre-miRNA, y el cambio de G por A produce un cambio de energía positivo, en esta ocasión sin variar la estructura secundaria. Dicho cambio de energía, tal y como se ha descrito anteriormente (Soemedi et al., 2017), podría desestabilizar el miRNA, haciendo que hubiera niveles más bajos. Como consecuencia, los genes diana se expresarían más.

Entre los genes diana predichos para hsa-mir-378d-1 se encuentra la vía de señalización de mTOR. La vía de señalización de mTOR juega un papel importante en la proliferación, diferenciación, crecimiento y supervivencia celular (Pópulo et al., 2012). Además, la desregulación de esta vía de señalización se considera significativa en la patogénesis de LLA y es crítica para la resistencia a fármacos y fallo de la terapia (Tasian et al., 2014). Asimismo, se conoce que la expresión de mTOR está significativamente asociada con el riesgo de recaída; por lo que su actividad podría ser considerada un factor de riesgo alto

en LLA-B pediátrica (Ulińska et al., 2016). Por todo ello, el aumento de la expresión de esta ruta debido a la desestabilización del miRNA podría estar detrás de un mayor riesgo de sufrir una recaída, así como de una disminución en la SG.

Otro aspecto a mencionar sobre hsa-mir-378d-1 es que en la literatura hay trabajos que relacionan este miRNA con el pronóstico de otros cánceres. Más concretamente, en el caso del adenocarcinoma de colon este miRNA ha sido descrito como un biomarcador potencial para la SG (Wei et al., 2018). Estos estudios reforzarían los resultados obtenidos en el análisis de LLA-B, ya que apoyarían la importancia de hsa-mir-378d-1 en el pronóstico.

Por último, en el caso de rs74469188 en hsa-mir-6504, se observó un descenso en la SG en homocigotos para el alelo C; habiendo también una asociación en el caso de la SLE. Este cambio induce un cambio de energía positivo y un cambio de la estructura; lo que podría desestabilizar el miRNA y hacer que hubiera niveles más bajos del miRNA maduro. En cualquier caso, al realizar la predicción de genes diana ninguno de los obtenidos fue predicho por 6 o más bases de datos. Esto se podría deber a que no se haya investigado mucho sobre este miRNA, y por tanto, no se tendría mucha información sobre sus posibles dianas.

Finalmente, cabe recalcar que el estudio también presenta ciertas limitaciones. El número de pacientes que experimentaron recaídas o fallecieron es limitado, y por lo tanto, habría que validar los resultados obtenidos en otras poblaciones, para poder así confirmar su valor pronóstico. Otra limitación que presenta el estudio es que el fallo de genotipado es relativamente alto. De todas formas, este problema se aceptó desde un principio, ya que no se podía realizar otro diseño para amplificar los polimorfismos específicos. Por último, hay que tener en cuenta que los algoritmos de predicción de las bases de datos no son del todo precisos; pero a día de hoy, esta es una limitación que hay que asumir.

CONCLUSIONES

En este trabajo se han encontrado 19 SNPs en miRNAs que pueden estar asociados con el pronóstico de LLA-B, ya sea con la SLE, SG o ambas. Entre ellos, rs17797090 en hsa-mir-3652, rs28645567 en hsa-mir-378d-1 y rs74469188 en hsa-mir-6504 fueron los que presentaban la asociación más fuerte. El estudio *in silico* muestra que los tres SNPs pueden tener un efecto en la estabilidad del miRNA y, por tanto, tener un efecto sobre sus dianas en las rutas de señalización; entre las que están la vía de señalización de Ras o mTOR. Esto explicaría su posible valor pronóstico. Para poder confirmar el papel pronóstico de estos SNPs, sería necesario validar estos resultados en nuevas cohortes de pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

Afonso-Grunz, F. & Müller, S. (2015). Principles of miRNA-mRNA interactions: beyond sequence complementarity. *Cell Mol Life Sci.* 72(16): 3127-3141.

- Armand-Labit, V. & Pradines, A. (2017). Circulating cell-free microRNAs as clinical cancer biomarkers. *Biomol Concepts*. 8(2): 61-81.
- Chiaretti, S., Gianfelici, V., Ceglie, G. & Foà, R. (2014). Genomic characterization of acute leukemias. *Med Princ Pract*. 23(6): 487-506.
- Gong J., Tong, Y., Zhang, H.M., Wang, K., Hu, T., Shan, G., Sun, J. & Guo, A.Y. (2012). Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. *Hum Mutat*. 33(1): 254-263.
- Guo, Z., Shu, Y., Zhou, H. & Zhang, W. (2016). Identification of diagnostic and prognostic biomarkers for cancer: focusing on genetic variations in microRNA regulatory pathways (review). *Mol Med Rep*. 13(3): 1943-1952.
- Gutierrez-Camino, A., Garcia-Obregon, S., Lopez-Lopez, E., Astigarraga, I. & Garcia-Orad, A. (2019). MicroRNA as a diagnostic biomarker in childhood acute lymphoblastic leukemia; systematic review. Submitted to *Epigenomics*.
- Irving, J.A. (2016). Towards an understanding of the biology and targeted treatment of paediatric relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 172(5): 655-666.
- Kato, M. & Manabe, A. (2018). Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Int*. 60(1): 4-12.
- Li, M.P., Hu, Y.D., Hu, X.L., Zhang, Y.J., Yang, Y.L., Jiang, C., Tang, J. & Chen, X.P. (2016). MiRNAs and miRNA polymorphisms modify drug response. *Int J Environ Res Public Health*. 13(11): 1096.
- Lim, J.Y.S., Bhatia, S., Robison, L.L. & Yang, J.J. (2014). Genomics of racial and ethnic disparities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 120(7): 955-962.
- Moorman, A.V. (2016). New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 101(4): 407-416.
- Pópulo, H., Lopes, J.M. & Soares, P. (2012). The mTOR signaling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci*. 13(2): 1886-1918.
- Pui, C.H., Yang, J.J., Hunger, S.P., Pieters, R., Schrappe, M., Biondi, A., Vora, A., Baruchel, A., Silverman, L.B., Schmiegelow, K., Escherich, G., Horibe, K., Benoit, Y.C.M., Izraeli, S., Yeoh, A.E.J., Liang, D.C., Downing, J.R., Evans, W.E., Relling, M.V. & Mullighan, C.G. (2015). Childhood acute lymphoblastic leukaemia: progress through collaboration. *J Clin Oncol*. 33(27): 2938-2948.
- Soemedi, R., Cygan, K.J., Rhine, C., Glidden, D.T., Taggart, A.J., Lin, C.L., Fredericks, A.M. & Fairbrother, W.G. (2017). The effects of structure on pre-mRNA processing and stability. *Methods*. 125: 36-44.
- Swellam, M. & El-Khazragy, N. (2016). Clinical impact of circulating microRNAs as blood-based marker in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Tumour Biol*. 37(8): 10571-10576.
- Tasian, S.K., Teachey, D.T. & Rheingold, S.R. (2014). Targeting the PI3K/mTOR pathway in pediatric hematologic malignancies. *Front Oncol*. 4: 108.
- Ulińska, E., Mycko, K., Sałacińska-Łoś, E., Pastorczak, A., Siwicka, A., Młynarski, W. & Matysiak, M. (2016). Impact of mTOR expression on clinical outcome in paediatric patients with B-cell acute lymphoblastic leukaemia – preliminary report. *Contemp Oncol (Pozn)*. 20(4): 291-296.
- Wei, H.T., Guo, E.N., Liao, X.W., Chen, L.S., Wang, J.L., Ni, M. & Liang, C. (2018). Genome-scale analysis to identify potential prognostic microRNA biomarkers for predicting overall survival in patients with colon adenocarcinoma. *Oncol Rep*. 40(4): 1947-1958.