



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

Facultad de Ciencias Químico Biológicas

Maestría en Ciencias Biomédicas

**Expresión de miR-26b, miR-100 y uno de sus
genes blanco en células de leucemia
linfoblástica aguda**

TESIS

**Que para obtener el grado de:
Maestría en Ciencias Biomédicas**

PRESENTA:

Q.B.P. LUIS ANTONIO MARTÍNEZ JIMÉNEZ

Director de tesis: Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

Co-directora de tesis: Dra. Yazmín Gómez Gómez



Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, enero de 2020

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUCCIÓN	3
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	6
V. RESULTADOS	8
VI. DISCUSIÓN	18
VII. CONCLUSIÓN	22
VIII. ANEXOS	24
IX. REFERENCIAS	26

I. RESUMEN

Introducción: Los microRNAs participan en la regulación de la expresión génica en múltiples procesos celulares, incluida la leucemogénesis. miR-26b y miR-100 en leucemia linfoblástica aguda (LLA) presentan una desregulación en su expresión. El objetivo del estudio fue evaluar la expresión de miR-26b, miR-100 y uno de sus genes blanco, identificados *in silico*, en células de LLA. **Materiales y métodos:** Mediante análisis *in silico* se identificaron mRNA blancos para miR-26b y miR-100. Se utilizaron cultivos primarios de linfocitos de sujetos sin LLA y líneas celulares de LLA para cuantificar la expresión de miR-26b, miR-100 y sus mRNA blanco mediante RT-qPCR. Los cambios en la expresión fueron calculados con el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Se utilizó western blot para la detección a nivel proteico de los mRNA blanco. Se realizó un análisis bioinformático para conocer la expresión de miR-26b, miR-100 y sus mRNA blanco en LLA. Los datos fueron analizados en el software GraphPad v7.0 y una $p \leq 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa. **Resultados:** Encontramos a miR-26b disminuido en las líneas celulares de LLA, en comparación con el cultivo primario, mientras que miR-100 muestra un aumento en su expresión. LEF1 y DNMT3A fueron seleccionados como blancos de miR-26b y miR-100, respectivamente, ambos genes se expresan específicamente en linfocitos pro-B y pre-B. Encontramos un aumento en la expresión de LEF1 y DNMT3A en las líneas celulares de LLA, en comparación con el cultivo primario. Mientras, que solo se detectó la proteína LEF1 y DNMT3A en las líneas celulares de LLA. Al comparar con bases de datos publicadas de pacientes con LLA, obtuvimos datos similares. **Conclusión:** miR-26b es sub-expresado y miR-100 sobre-expresado en líneas celulares con LLA. miR-26b presenta una correlación inversa con LEF1, mientras que miR-100 y DNMT3A son correlacionados positivamente, ambos genes blancos a nivel proteico solo fueron detectados en células de LLA.

Palabras clave: Leucemia linfoblástica aguda, miR-26b, miR-100, LEF1 y DNMT3A.

II. ABSTRACT

Introduction: MicroRNAs participate in the regulation of gene expression in multiple cellular processes, including leukemogenesis. miR-26b and miR-100 in acute lymphoblastic leukemia (ALL) have a deregulation in their expression. The objective of the study was to evaluate the expression of miR-26b, miR-100 and one of its target genes, identified *in silico*, in ALL cells. **Materials and methods:** By *in silico* analysis, white mRNAs were identified for miR-26b and miR-100. Primary lymphocyte cultures of subjects without ALL and ALL cell lines were used to quantify the expression of miR-26b, miR-100 and their white mRNA by RT-qPCR. Changes in expression were calculated with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Western blotting was used for the protein level detection of white mRNAs. A bioinformatic analysis was performed to know the expression of miR-26b, miR-100 and its white mRNA in ALL. The data were analyzed in GraphPad software v7.0 and a $p \leq 0.05$ was considered statistically significant. **Results:** We found a reduced miR-26b in ALL cell lines, compared to the primary culture, while miR-100 shows an increase in its expression. LEF1 and DNMT3A were selected as miR-26b and miR-100 targets, respectively, both genes are specifically expressed in pro-B and pre-B lymphocytes. We found an increase in the expression of LEF1 and DNMT3A in the cell lines of ALL, compared to the primary culture. Meanwhile, that only the LEF1 and DNMT3A protein was detected in the ALL cell lines. When comparing with published databases of patients with ALL, we obtained similar data. **Conclusion:** miR-26b is under-expressed and miR-100 is over-expressed in cell lines with ALL. miR-26b has an inverse correlation with LEF1, while miR-100 and DNMT3A are positively correlated, both white genes at the protein level were only detected in ALL cells.

Key words: Acute lymphoblastic leukemia, miR-26b, miR-100, LEF1 and DNMT3A.

III. INTRODUCCIÓN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) se caracteriza por la proliferación descontrolada de progenitores linfoides en la medula ósea (Crazzolaro y Bendall, 2009) que se manifiesta tanto en niños como en adultos, con una prevalencia entre los 2 y 5 años de edad. La mayoría de las LLA son de linaje B (LLA-B) con un 85% (Pui *et al.*, 2009), seguidas del linaje T con un 15% (LLA-T) (Ferrado *et al.*, 2002). Existen diversos estudios en población pediátrica que han identificado síndromes que predisponen a una minoría de casos de LLA, como el síndrome de Down, el síndrome de Bloom y anemia de Fanconi (Shah *et al.*, 2013; Bielorai *et al.*, 2013; Chessells *et al.*, 2001), otros factores de riesgo incluyen; la exposición a radiaciones ionizantes, pesticidas, ciertos virus como el virus de Epstein Barr (Spector *et al.*, 2013; Sehgal *et al.*, 2010) y translocaciones cromosómicas. Las principales translocaciones incluyen; t (12; 21) [*ETV6-RUNX1*], t (1; 19) [*TCF3-PBX1*], t (9; 22) [*BCR-ABL1*] y reordenamiento de *MLL* (Iacobucci y Mullighan, 2017; Mullighan 2012; Godley y Shimamura, 2017). La supervivencia en LLA pediátrica ha mejorado aproximadamente un 90% gracias a los ensayos de estratificación de riesgo por características biológicas y la respuesta al tratamiento (Terwilliger y Abdul-Hay, 2017). Sin embargo, se necesitan enfoques innovadores para mejorar aún más la supervivencia.

El descubrimiento de microRNAs (miRNAs) ha traído una nueva visión de la patogénesis de muchas enfermedades, incluyendo LLA (Luan *et al.*, 2015). Los miRNAs son una clase de RNA no codificantes de aproximadamente 19-25 nucleótidos de longitud que regulan múltiples procesos celulares; diferenciación, supervivencia celular, apoptosis, proliferación, metabolismo, invasión y metástasis (Bracken *et al.*, 2016), por unión a RNAs mensajeros blanco e inducción de su represión postranscripcional (Filipowicz *et al.*, 2008; Rupaimoole y Slack, 2017). Los miRNAs pueden funcionar como oncogenes o supresores de tumor dependiendo de las funciones de sus genes blanco (Svoronos *et al.*, 2016). Distintos estudios han reportado la importancia de los miRNAs en la patobiología de LLA (Mi *et al.*, 2007; Yeh *et al.*, 2016; Kotaki *et al.*, 2017). Por lo tanto, el perfil de expresión de miRNAs

puede ser usado como biomarcador en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento (Simioni *et al.*, 2018).

miR-26b es miembro de la familia miR-26 y se encuentra localizado en el cromosoma 2 en la posición 2q35 (Kulshreshtha *et al.*, 2007). La disminución de miR-26b se ha relacionado con el desarrollo de diferentes tipos de cánceres y el aumento con funciones supresoras de tumor; en glioma miR-26b inhibe proliferación, migración e invasión mediante la disminución de EphA2; en cáncer colorrectal disminuye la proliferación y la migración por la inhibición de la expresión de LEF1 y FUT4; en cáncer hepatocelular suprime la proliferación, angiogénesis y apoptosis por la disminución de cadherina- VE, Snail y MMP2, y en cáncer de vejiga inhibe migración e invasión por la disminución de PLOD2 (Wu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014; Miyamoto *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017). Yuan y colaboradores en el 2017, en muestras y líneas celulares de LLA-T observaron niveles bajos de miR-26b, al aumentar de manera ectópica sus niveles de expresión disminuye la proliferación celular y aumenta la apoptosis por la inactivación *in vitro* e *in vivo* de la vía PI3K/AKT, al unirse de manera directa con PIK3CD (Yuan *et al.*, 2017), lo que sugiere que miR-26b está participando como un supresor de tumor en LLA-T.

miR-100 es miembro de la familia miR-99 y se encuentra localizado en el cromosoma 11 en 11q24.1 (Qin *et al.*, 2015). En diferentes tipos de cánceres se ha reportado la expresión alterada de miR-100 con resultados controversiales, ya que puede tener funciones como oncogén o supresor de tumor (Li *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). Se ha reportado que el aumento de miR-100 y miR-99a en LMA arresta la diferenciación de los granulocitos y monocitos, promoviendo la supervivencia celular. Mientras que en LLA se han encontrado niveles bajos de miR-100 y miR-99a, lo que sugiere que miR-100 tiene funciones diferentes en leucemias de diferente linaje (Zhang *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2012). Sin embargo, existe evidencia de la relación del aumento de miR-125b, miR-99a y miR-100 con quimio-resistencia a vincristina y daunorrubicina en LLA (Schotte *et al.*, 2011; Akbari *et al.*, 2013). En otro estudio, se observó la disminución de miR-100, miR-196b y Let-7e

en muestras de LLA, pero un aumento en aquellas que presentaban la translocación t(12;21), comparado con muestras de medula ósea normal en niños (de Oliveira *et al.*, 2012).

Sobre la base de un análisis bioinformático, LEF1 y DNTT fueron seleccionados como blancos de miR-26b y miR-100, respectivamente. Ambos genes juegan un papel muy importante en la ontogenia de los linfocitos B (McBride *et al.*, 2017; Motea y Berdis, 2010) y las alteraciones en su expresión se ha relacionado con el desarrollo de LLA (Guo *et al.*, 2015; Gholami *et al.*, 2017), así la regulación mediada por miRNAs podría estar involucrada en la patología de esta neoplasia. El objetivo de este estudio fue evaluar en células de leucemia linfocítica tipo B los niveles de expresión de miR-26b y miR-100, y el comportamiento de la expresión de sus respectivos genes blanco LEF1 y DNTT, previamente seleccionados.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Se realizaron cultivos primarios de linfocitos a partir de sangre periférica de sujetos sin LLA. Las líneas celulares de LLA; NALM6 y RS4; 11 se adquirieron de la *American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)*. El cultivo primario de linfocitos y las líneas celulares se cultivaron utilizando el medio RPMI 1640 (*ATCC, Manassas, VA, USA*), suplementado con suero fetal bovino al 10% (*ATCC, Manassas, VA, USA*) e incubados a 37 °C y 5% de CO₂.

Extracción de RNA total

El RNA total se extrajo de cultivos primarios de linfocitos y de las líneas celulares utilizando el reactivo TRIzol (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU*) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del RNA se evaluó por espectrofotometría en el Nanodrop 2000c. La integridad del RNA se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Cuantificación de los niveles de miRNAs y RNAm utilizando PCR en tiempo real

Para detectar los niveles de miR-26b y miR-100 en los cultivos primarios de linfocito, NALM6 y RS4; 11, aproximadamente 5-10 ng de RNA total se transcribieron de manera inversa a cDNA con primers de RT específicos utilizando el Kit “TaqMan MicroRNA Reverse Transcription” (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU*). La qPCR stem-loop [miR-26b (ID 000407) y miR-100 (000437)] se utilizó para detectar los niveles de miRNAs por “TaqMan MicroRNA Reverse Transcription” (*Applied Biosystems*). Los ciclos de PCR fueron los siguientes: 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min. Las reacciones de RT-qPCR se realizaron en el sistema de detección BIO-RAD CFX96 (*BioRad Laboratories, Hercules, EUA*). La expresión relativa de los miRNAs se normalizó a la expresión del control endógeno RNU6B (001093; *Applied Biosystems*).

Para la cuantificación de los mRNA, 1 µg de RNA total se transcribió de forma inversa en cDNA mediante primers con oligo (dT) y la síntesis de cDNA por el Kit “SuperScript™ II First Strand Syntesis (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La RT-qPCR se realizó en el *sistema de detección BIO-RAD CFX96 (BioRad Laboratories, Hercules, EUA)*, y utilizando SYBR Green

(PCR Reagents kit; Applied Biosystems) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las PCR se procesaron a través de 40 ciclos de una PCR de 3 pasos, incluyendo 60 segundos de desnaturalización a 95 °C, 60 segundos a la temperatura de alineamiento dependiente de cada primer y 60 segundos de elongación dependiente de la plantilla a 72° C. Los oligonucleótidos empleados fueron; *LEF1* F 5-AAATGGGTCCCTTTCTCCAC-3', R 5-TCGTCGCTGTAGGTGATGAG-3' (Yu *et al.*, 2012), *DNTT* F 5-AGACTCCACCAATTGCTGTACA-3', R 5-TCAGAGTTCTGAAACCCATCCT-3' (Taplin *et al.*, 1996) y la expresión relativa de los genes fue normalizada con respecto a la expresión de GAPDH F 5- GTGAACCATGAGAAGTATGACAAC-3', R 5- CATGAGTCCTTCCACGATACC-3'. La expresión de los miRNAs y mRNA se determinó a partir del ciclo umbral (C_T), y los niveles relativos de expresión se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Western-blot

El cultivo primario de linfocitos y las líneas celulares fueron lisadas utilizando el buffer de lisis (25 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS) suplementado con inhibidores de proteasas (Sigma, P2714). El homogenizado resultante se centrifugó a 14,000 rpm por 20 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se almacenó hasta su posterior uso. La concentración de proteína se determinó utilizando el método Bradford (Bradford, 1976). Las proteínas (30 µg) se procesaron en condiciones desnaturalizantes utilizando un volumen igual de buffer de muestra (Tris-HCl 100 mM (pH 6,8), SDS al 4%, 2-ME al 8%, glicerol al 20% y azul de bromofenol). Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE al 12.5% y los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, las cuales fueron bloqueadas por una hora con leche libre de grasa al 5% en TBS 1X (Tris-HCl 20 mmol/L pH 7.5, NaCl 150 mmol/L). Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios de anti-LEF1 (ab137872, Abcam, USA), anti-DNTT (ab68886, Abcam, USA) a una dilución 1/1000 y α -actina (sc-32251, Santa Cruz Biotechnology, USA) a una dilución 1/5000. Las membranas se lavaron 3 veces por 10 minutos con TBS-T 1X (Tris-HCl 20 mmol/L pH 7.5, NaCl 150 mmol/L y Tween-20 0.1%) e incubadas por una hora con el anticuerpo secundario anti-ratón o anti-

conejo acoplados a peroxidasa de rábano (Thermo Fisher Scientific). Las membranas se revelaron con “Immobilon western chemilum HRP substrate” (WBKLS0100, Merck, USA), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. La quimioluminiscencia se detectó usando el ChemiDoc XRS+ (Biorad, USA). Las imágenes del western blot fueron cuantificadas utilizando el software Imagen J (versión 1.44, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Análisis bioinformático

Para analizar la expresión de los miRNAs por tipo celular en condiciones normales se utilizó FANTOM5. Mientras que para la selección del blanco de los miRNAs se utilizaron bases de datos disponibles Target Scan, miRbase, Tarbase, microRNA, miRWalk 2.0 y búsqueda bibliográfica. Se hizo uso de análisis interactivo de perfiles de expresión génica (GEPIA) para comparar los datos de RNA-Seq de los blancos de miR-26b y miR-100 entre muestras con y sin LLA (Tang et al., 2017). La relación entre los miRNAs y sus blanco fue a través de cBioPortal (Gao, *et al.*, 2013).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism (v7.0; GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE. UU.). Se usó la prueba de Mann-Whitney para comparar las diferencias entre los niveles de expresión de miRNA, mRNA y proteína entre los grupos y los resultados se presentaron como media \pm desviación estándar (SD). Los valores de $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ y $***p < 0,001$, fueron consideradas estadísticamente significativas.

V. RESULTADOS

Niveles de expresión de miR-26b y miR-100 en líneas celulares de LLA.

Inicialmente se realizó un análisis exploratorio de los niveles de expresión de miR-26b y miR-100, utilizando la plataforma FANTOM5 (miRNA Expression 1.0.0-alpha.6). FANTOM5 utiliza datos de secuenciación de RNA pequeños (sRNA) para crear un atlas de expresión de miRNAs en humano sin ninguna patología. Anotan cada miRNA en función de su perfil de expresión en todos los tipos de célula. En la figura 1 se muestran niveles altos de miR-26b en células de origen hematopoyético, y menor en fibroblastos. Mientras que para miR-100 hay mayores niveles en células musculares y menor expresión en células de origen hematopoyético.

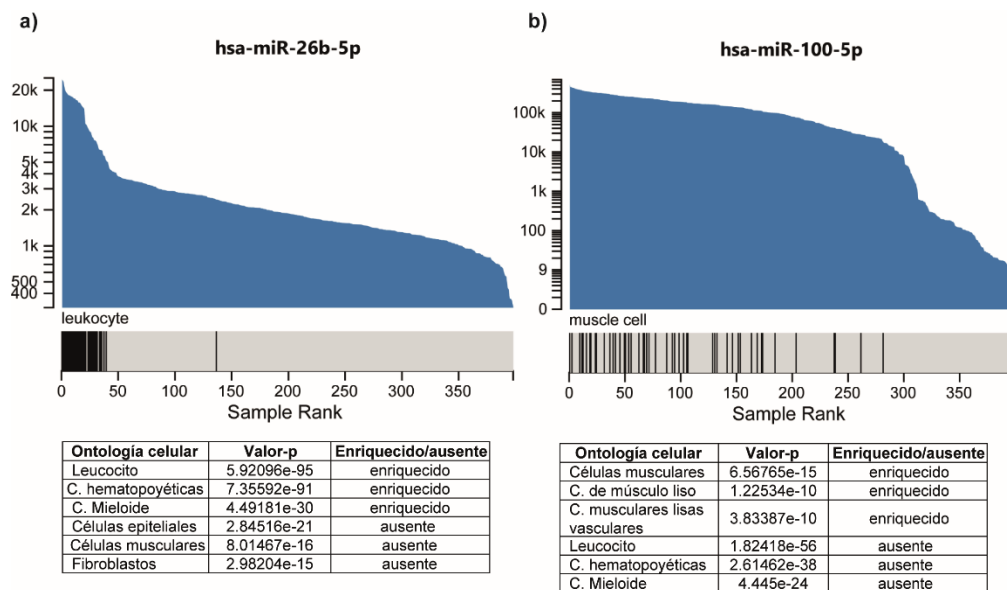


Figura 1. Expresión de miR-26b y miR-100 por tipo celular realizado en FANTOM5.

La expresión de miR-26b y miR-100 fue evaluada en las líneas celulares de LLA; NALM6, RSA; 11 y en cultivos primarios de linfocitos mediante RT-qPCR. Para ello se extrajo el RNA a partir de tres cultivos independientes. El total de las muestras de RNA presentó una buena concentración, pureza e integridad aceptable (anexo 1).

La expresión de miR-26b fue menor en las líneas celulares NALM6 y RS4; 11 en comparación con linfocitos normales del cultivo primario (Figura 2). En contraste, la expresión de miR-100 fue mayor en NALM6 y RS4; 11, comparadas con el cultivo primario de linfocitos (Figura 3).

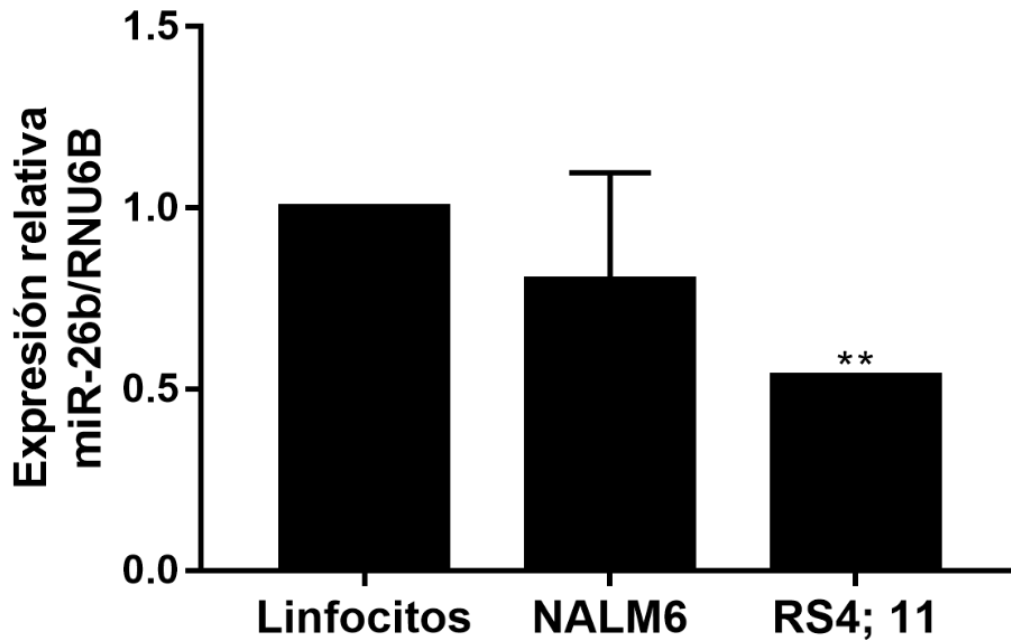


Figura 2. Expresión de miR-26b en cultivo primario de linfocitos y células de LLA. La expresión de miR-26b fue evaluada mediante ensayos “TaqMan MicroRNA Assay” y normalizados a RNU6B. Las barras representan la media de expresión, y las líneas \pm SD. La prueba Mann Whitney fue empleada para determinar las diferencias en expresión. Las diferencias se consideraron significativas * $P \leq 0.05$.

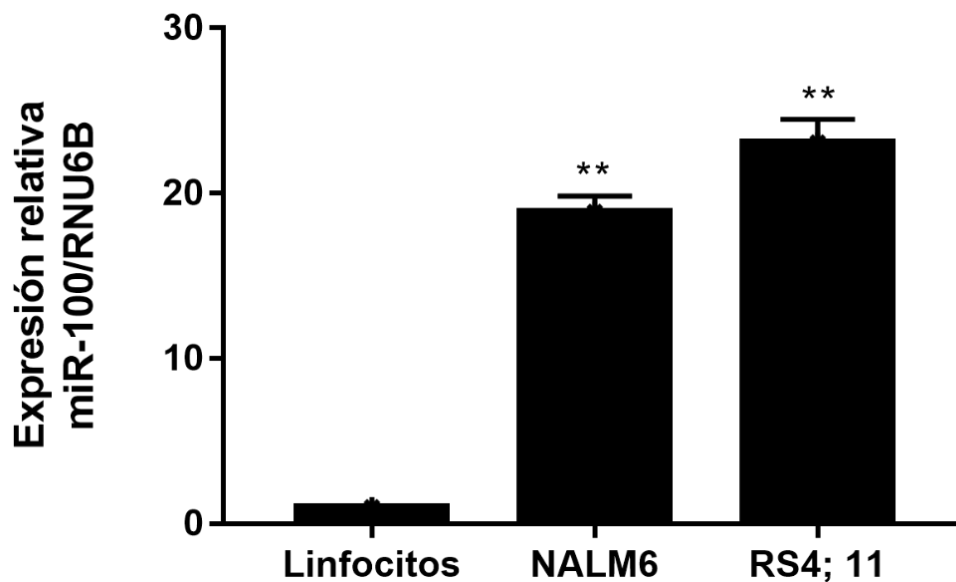


Figura 3. Expresión de miR-100 en cultivo primario de linfocitos y células de LLA. La expresión de miR-100 fue evaluada mediante ensayos “TaqMan MicroRNA Assay” y normalizados a RNU6B. Las barras representan la media de expresión, y las líneas \pm SD. La prueba Mann Whitney fue empleada para determinar las diferencias en expresión. Las diferencias se consideraron significativas en * $P \leq 0.05$.

Selección de un mRNA blanco para miR-26b y miR-100 en LLA.

Mediante el uso de bases de datos como miRBASE, Tarbase, microRNA, miRWalk 2.0, TargetScan, RNAhybrid y búsqueda bibliográfica, se seleccionaron inicialmente 37 posibles mRNA blancos para miR-26b y 40 para miR-100, de acuerdo a su alto valor de score. Posteriormente, se sub-seleccionaron aquellos mRNA que participaran en procesos celulares más frecuentemente afectados en cáncer y que tuvieran participación en procesos hematopoyéticos, resultando así 11 mRNA seleccionados con miR-26b y miR-100 con 5. Finalmente, de acuerdo al número de sitios de reconocimiento para cada miRNA y su participación en la linfopoyesis, se seleccionó al factor de unión al potenciador linfoide 1 (LEF1) como mRNA blanco para miR-26b, el cual contiene dos sitios de unión para este miRNA. En el caso de miR-100, desoxinucleotidil tranferasa terminal (DNTT) fue seleccionado como uno de sus blanco, DNTT contiene dos sitios de unión para miR-100 (Figura 4).

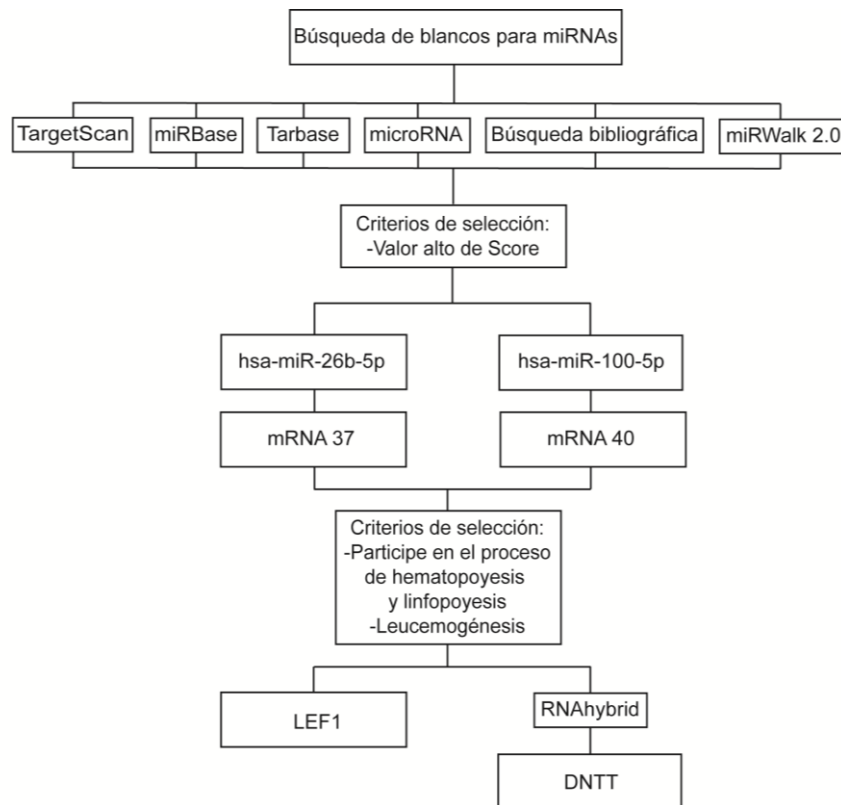


Figura 4. Diagrama para la selección del mRNA blanco para miR-26b y miR-100 en leucemia linfoblástica aguda.

Una vez seleccionado el mRNA blanco que cumpliera con los criterios de selección, se realizó un alineamiento entre las secuencias maduras de los miRNAs y la región 3' UTR de sus mRNA blanco. En la imagen 5a se muestran las dos interacciones que se han sido reportadas y validadas entre LEF1 y miR-26b. Sin embargo, la interacción entre miR-100 y DNTT no se ha reportado, pero si existe evidencia de que al aumentar la expresión de miR-100 disminuye DNTT (Moqadam *et al.*, 2013). Así que se hizo uso de RNAHybrid para demostrar que DNTT mantiene sitios de unión para miR-100, en la figura 5b se muestran dos posibles sitios de interacción, la interacción del panel superior tiene un valor mfe (energía libre mínima) de -21.0 kcal/mol, mientras que la interacción de la parte inferior tiene un valor de mfe de -19.5 kcal/mol (Figura 5). El mfe permite evaluar qué tan fuerte es la unión entre el miRNA y su mRNA blanco. Por lo tanto, entre más baja es la energía libre, mayor es la unión de miRNA: mRNA, lo que aumenta la probabilidad de que esta interacción ocurra realmente.

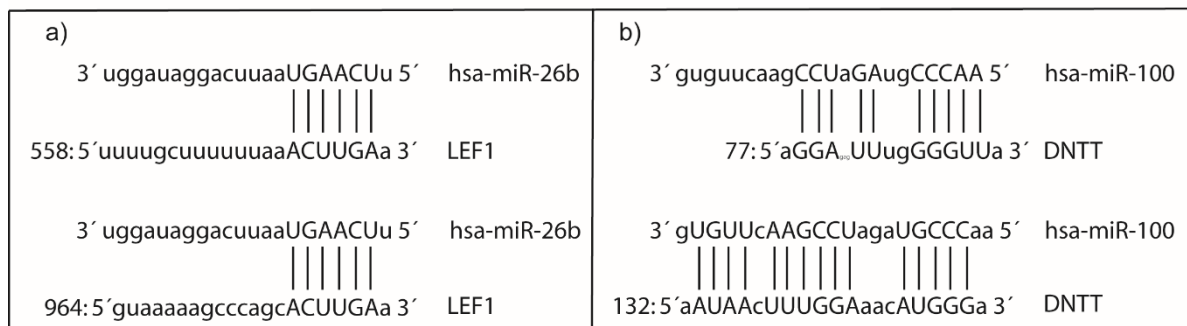


Figura 5. Alineamiento de miR-26b y miR-100 con sus mRNA blanco. En el inciso a, se muestra el alineamiento entre LEF1 y miR-26b. Mientras que en inciso b, se muestra el alineamiento entre DNTT y miR-100.

Expresión del factor de unión al potenciador linfoide 1 (LEF1) y desoxinucleotidil transferasa terminal (DNTT) en cultivo primario de linfocitos y líneas celulares de LLA.

Una vez seleccionados LEF1 y DNTT como mRNA blanco de miR-26b y miR-100, se analizó su expresión en LLA a través de datos previamente publicados. Para ello se utilizó un servidor web interactivo recientemente desarrollado para analizar los datos de expresión de secuenciación de RNA de 9,736 tumores y 8,587 muestras normales de los proyectos TGCA y GTEx (GEPIA) (Tang *et al.*, 2017). En la figura

6, LEF1 y DNNT exhiben mayor expresión en muestras de LLA, en comparación con las que no presentan LLA.

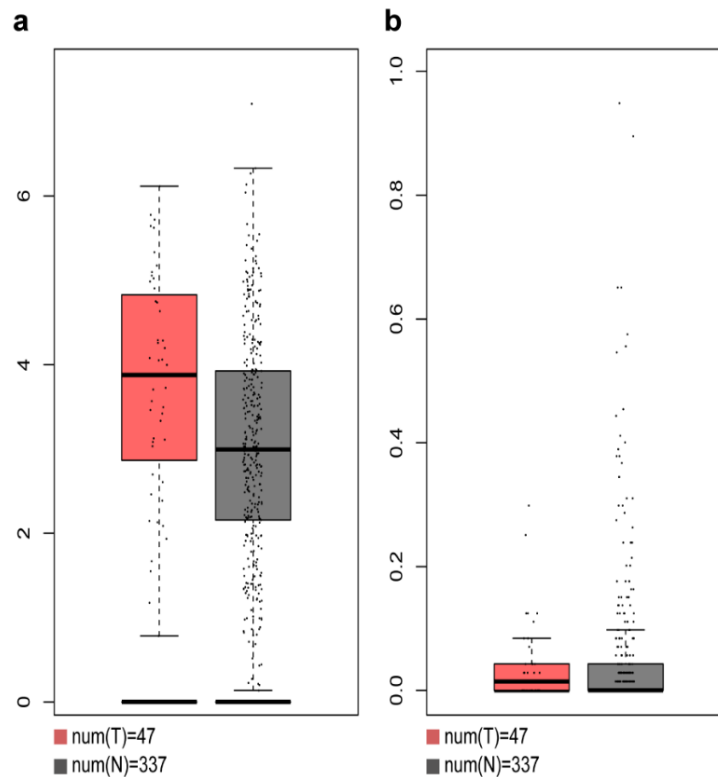


Figura 6. Expresión de LEF1 y DNNT en muestras con y sin LLA con datos de TCGA y GTEX. a. Expresión de LEF1 b. Expresión de DNNT. Los datos se obtuvieron del análisis de la base de datos GEPIA mediante el análisis interactivo de perfiles de expresión génica.

Posteriormente se continuó con el análisis de la expresión de LEF1 y DNNT mediante RT-qPCR. Para ello previamente se realizó el diseño de los oligonucleótidos y se utilizaron bajo las condiciones descritas en la metodología. En la figura 7, se muestra que la expresión de LEF1 es mayor en las líneas celulares NALM6 y RS4; 11, en comparación con el cultivo primario de linfocitos. Del mismo modo se analizó la expresión de DNNT y se muestra un aumento en su expresión en las líneas celulares de LLA, en comparación con el cultivo celular control de linfocitos (Figura 8).

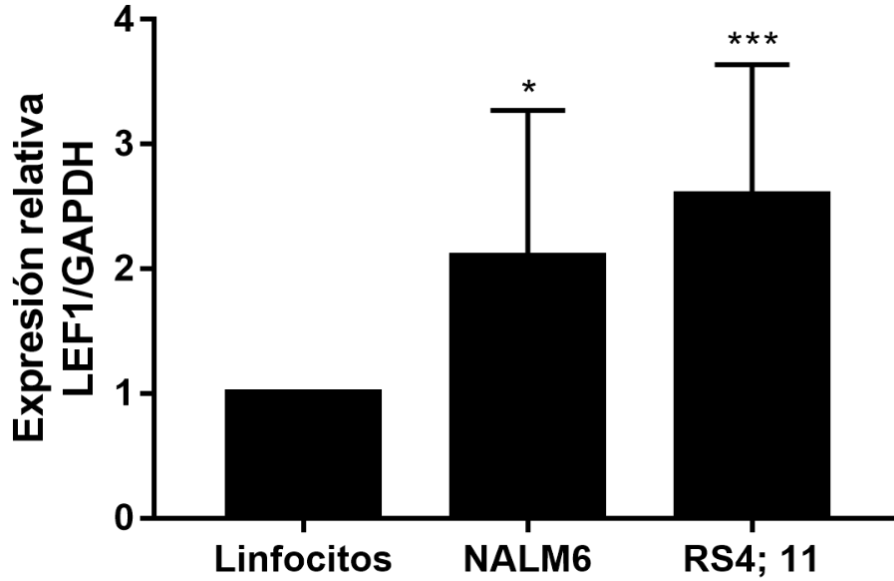


Figura 7. Expresión de LEF1 en células de LLA. Ensayos de RT-qPCR para LEF1 usando SYBR Green y normalizado a GAPDH. Las barras representan la media de expresión, y las líneas \pm SD. La significancia estadística se determinó con la prueba Mann Whitney. Las diferencias se consideraron significativas en $*P \leq 0.05$.

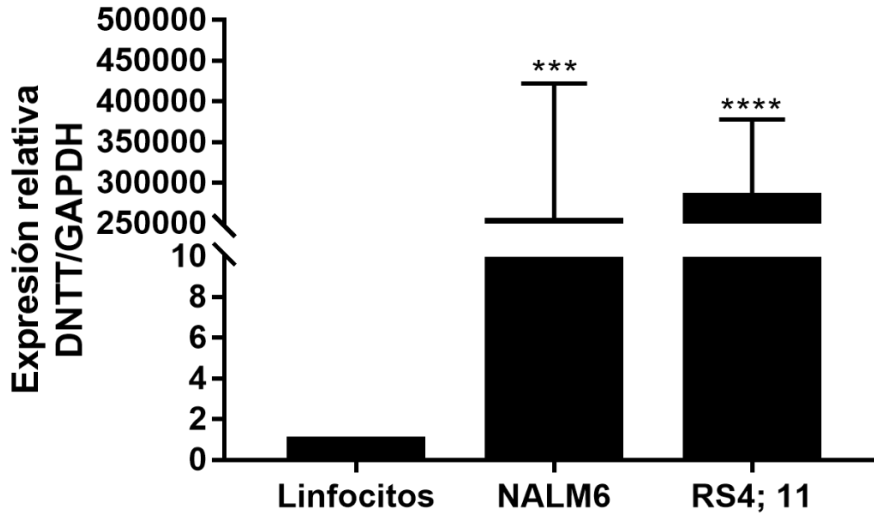


Figura 8. Expresión de DNTT en células de LLA. Ensayos de RT-qPCR para DNTT usando SYBR Green y normalizado con GAPDH. Las barras representan la media de expresión, y las líneas \pm SD. La significancia estadística se determinó con la prueba Mann Whitney. Las diferencias se consideraron significativas en $*P \leq 0.05$.

Después se analizó la relación entre la expresión de los miRNAs con sus respectivos blancos, para esto se utilizaron los datos de leucemia linfocítica aguda pediátrica-Fase II (TARGET, 2018), que incluye 1978 muestras en cBioPortal (datos provisionales de TCGA) (Gao *et al.*, 2013; Cerami *et al.*, 2012). En la figura 9a se muestra que cuando hay una disminución de miR-26b se presenta un aumento de LEF1. A pesar de que no hay suficientes datos de la expresión de miR-100 y LEF1 en LLA, si se observa una tendencia que al aumentar miR-100 disminuye DNTT.

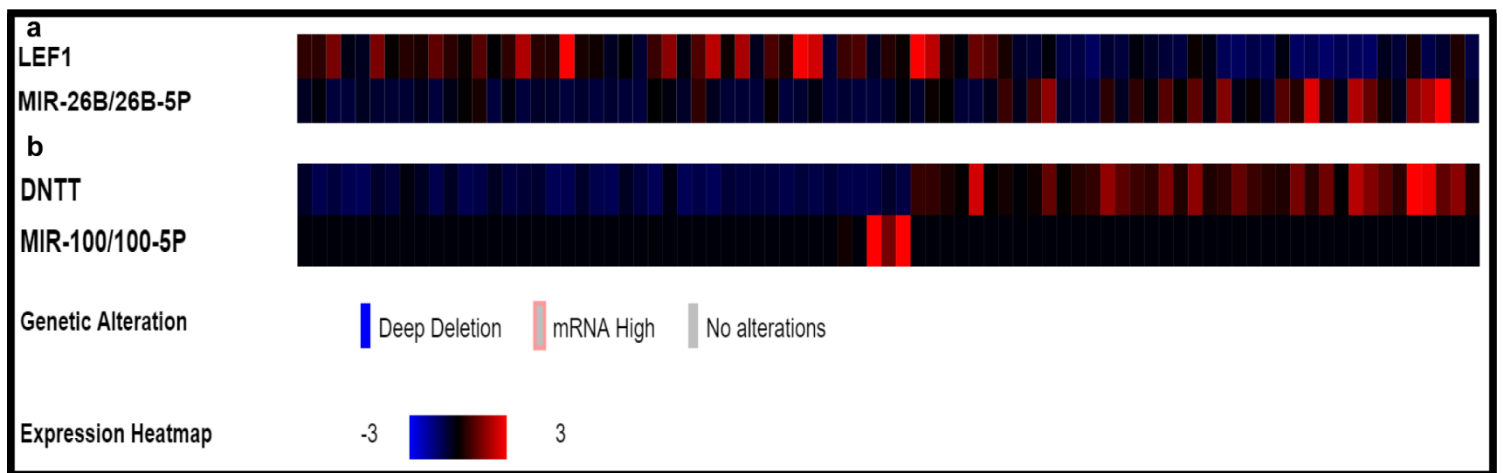


Figura 9. Mapa de calor de expresión de LEF1 comparada con miR-26b y DNTT comparada con miR-100.

Niveles proteicos de LEF1 y DNNT en cultivo primario de linfocitos y líneas de LLA.

Para determinar si el aumento en el mRNA de LEF1 y DNNT también se tradujo a nivel de proteína, se realizó un análisis de western blot en lisados a partir del extracto proteico del mismo conjunto del cultivo primario de linfocitos, NALM6 y RS4; 11. Como se muestra en la figura 10, solo NALM6 y RS4; 11 presentan LEF1 a nivel de proteína. Del mismo modo, se observó el mismo comportamiento para DNNT (Figura 11).

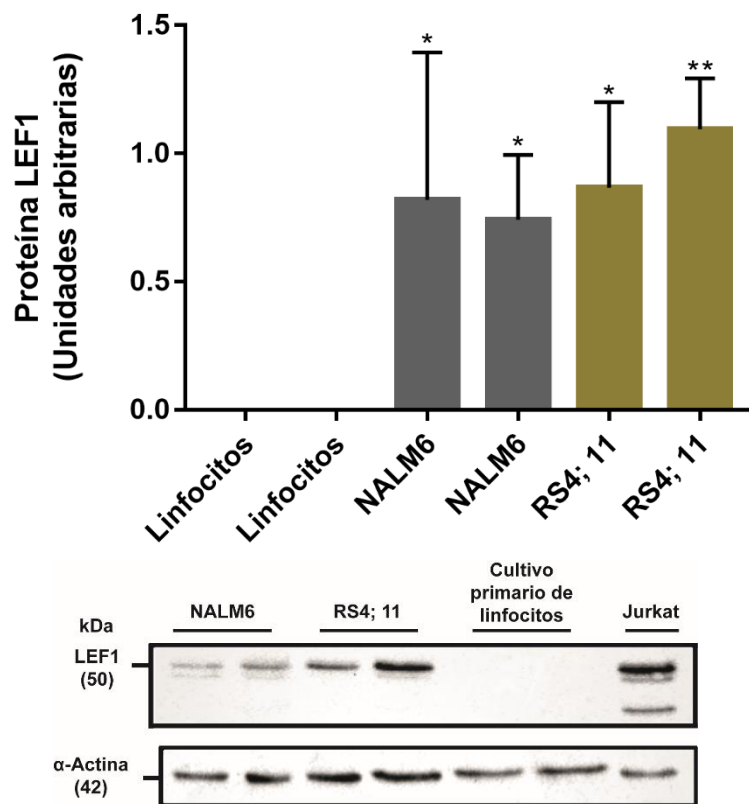


Figura 10. Niveles proteicos de LEF1 en cultivo primario de linfocitos, NALM6 y RS4; 11. Análisis de western blot (WB) y densitometría para LEF1 en cultivo primario de linfocitos, NALM6 y RS4; 11. Se utilizó a Jurkat como control positivo. Los experimentos de WB se realizaron en tres cultivos independientes y se normalizaron con α -actina. Las barras representan la media de expresión, y las líneas \pm SD. La significancia estadística se determinó con la prueba Mann Whitney y un valor de $p \leq 0.05$ representa diferencias estadísticamente significativas.

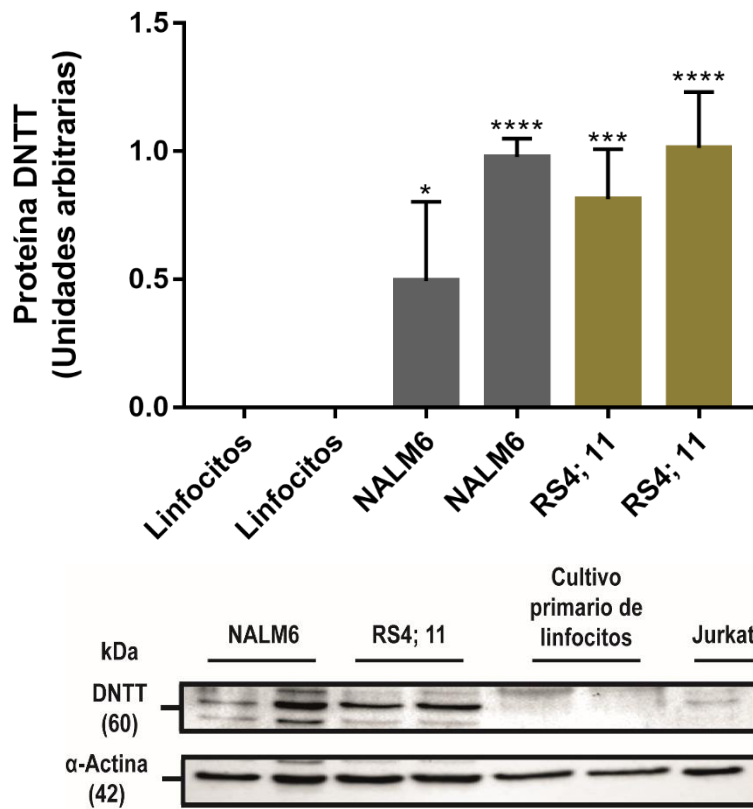


Figura 11. Niveles proteicos de DNTT en cultivo primario de linfocitos, NALM6 y RS4; 11. Análisis de western blot (WB) y densitometría para DNTT en cultivo primario de linfocitos, NALM6 y RS4; 11. Se utilizó a Jurkat como control positivo. Los experimentos de WB se realizaron en tres cultivos independientes y se normalizaron con α -actina. Las barras representan la media de expresión, y las líneas \pm SD. La significancia estadística se determinó con la prueba Mann Whitney y un valor de $p \leq 0.05$ representa diferencias estadísticamente significativas.

VI. DISCUSIÓN

Durante el proceso de linfopoyesis participan un gran número de factores de transcripción con papeles fundamentales, así que la alteración en la expresión y funcionalidad en alguno de ellos contribuye al desarrollo neoplásico. Entre las moléculas que recientemente se han relacionado con el desarrollo de leucemias, están los miRNAs, estos son una clase de RNA pequeños no codificantes, con funciones importantes en el desarrollo celular normal, así como en patologías como el cáncer (Esquela-Kerscher y Slack, 2006). Las funciones reguladoras de los miRNAs son esenciales para todos los niveles de desarrollo hematopoyético (Lazare *et al.*, 2014). Sin embargo, aún no está definido cuales miRNAs tienen propiedades oncogénicas o supresoras de tumor que definan el contexto de transformación de las células B malignas.

En el presente estudio se analizó la expresión de dos microRNAs; miR-26b y miR-100, así como la expresión de sus mRNA blancos (LEF1 y DNMT3A, respectivamente) en líneas celulares de LLA de tipo B, comparadas con cultivo primario de linfocitos. Para la selección de los mRNA blanco de los microRNAs en estudio, se hizo uso de bases de datos con validez experimental, así como diferentes algoritmos que predicen la interacción miRNA: mRNA (Figura 4 y 5).

Nuestros resultados muestran una disminución de la expresión de miR-26b en las líneas celulares de LLA-B, en comparación con el cultivo primario de linfocitos (Figura 2). Al realizar un análisis *in silico* de la expresión de miR-26b por tipo celular en condiciones normales en la plataforma FANTO5, se observa que hay un aumento de su expresión en células de origen hematopoyético (Figura 1a). A pesar de que no existen estudios donde se evalué la expresión de miR-26b en LLA-B, los resultados obtenidos son similares a los mostrados por Yuan y colaboradores en el 2017, en muestras y líneas celulares con LLA-T. Los autores plantean que miR-26b participa como supresor de tumor, ya que al aumentar su expresión reduce la proliferación y aumenta la apoptosis *in vitro*, del mismo modo dificulta la progresión de LLA *in vivo*. Además, demuestran que Ikaros modula la expresión de miR-26b (Yuan *et al.*, 2017). Mientras que el mRNA blanco seleccionado para miR-26b fue LEF1, el cual es un factor de transcripción miembro de la familia LEF/TCF e

importante mediador de la vía Wnt. La mayoría de reportes describen que la vía canónica de Wnt tiene un papel crucial en la regulación de la hematopoyesis, debido a que participa en la regulación de la proliferación, supervivencia y diferenciación (Luis *et al.*, 2011; Luis *et al.*, 2012; Niehrs, 2012). En la vía canónica, la unión de Wnt a receptores Frizzled (Fz), resulta en la inhibición de la GSK-3 β (glucógeno sintasa quinasa 3), la cual fosforila y determina la degradación proteosómica del co-activador transcripcional β -catenina. La inhibición de GSK-3 β permite la acumulación citosólica de β -catenina y su posterior translocación al núcleo donde se asocia a factores de transcripción TCF (T Cell Factor) / LEF (Lymphoid Enhancer-binding Factor) activando la transcripción de genes blancos de la vía Wnt (Zhan *et al.*, 2017). Nosotros proponemos que miR-26b puede regular la expresión de LEF1 en LLA, debido a los datos publicados por Zhang y colaboradores en el 2014, donde validan que LEF1 es un blanco directo de miR-26b en cáncer de colon (Zhang *et al.*, 2014). Se ha reportado que LEF1 juega un papel importante en la linfopoyesis, normalmente es expresado en linfocitos pro-B y pro-T pero no en linfocitos B maduros (Reya *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2012; McBride *et al.*, 2017). En el presente estudio se muestra un aumento de la expresión de LEF1 en las líneas celulares de LLA-B, en comparación con el cultivo primario de linfocitos (Figura 7). Al momento de comparar la expresión de LEF1 en la plataforma GEPIA se puede observar un aumento en muestras con LLA, en comparación sin LLA (Figura 6a). En un estudio realizado en pacientes egipcios con LLA-B muestran una expresión de LEF1 aumentada (Aly y Yousef, 2015), mientras que en pacientes chinos con LLA, el 25% manifiesta una alta expresión de LEF1, y además se asocia a factores de alto riesgo, como; alta WBC y positivos con el cromosoma filadelfia (Guo *et al.*, 2015). Nosotros también encontramos que solo NALM6 y RS4; 11 expresan a LEF1 a nivel de proteína, en comparación con el cultivo primario de linfocitos, lo cual sugiere una posible regulación de LEF1 a través de miR-26b en LLA-B, sin embargo, estudios funcionales son necesarios para comprobarlo (Figura 10). Existen reportes que han relacionado los niveles altos de LEF1 con quimioresistencia y recaída en pacientes pediátricos con LLA (Fu *et al.*, 2018). No obstante, solo pudimos detectar la isoforma completa de LEF1 (LEF1-FL) (50 kDa) en NALM6 y RS4; 11, en comparación con

la línea celular Jurkat (LLA-T) que presenta las isoformas corta (40 kDa) y completa de LEF1 (Figura 10). La isoforma corta de LEF1 (LEF1- Δ L) carece del dominio de unión a β -catenina. LEF1- Δ L es considerado como un antagonista natural de la vía WNT, debido a su capacidad de interactuar con cofactores que también se unen a LEF1-FL, así como a competir por los sitios de unión al DNA (Hovanes *et al.*, 2000; Jimenez *et al.*, 2005). En cáncer de colon la sobre-expresión de LEF1- Δ L inhibe el crecimiento de células tumorales en modelos *in vitro* e *in vivo* (Wang *et al.*, 2012), mientras que en el desarrollo de LLA-T disminuyen los niveles de LEF1- Δ L y aumentan los niveles de LEF1-FL (Tiemessen *et al.*, 2012).

En contraste a miR-26b, la expresión de miR-100 está aumentada en las líneas celulares de LLA-B y disminuida en el cultivo primario de linfocitos (Figura 3). Analizando la expresión de miR-100 en FANTO5 se puede observar una disminución en las células de origen hematopoyético en condiciones normales (figura 1b). Nuestros resultados son similares con los obtenidos en un estudio previo donde encontraron un aumento de miR-100 en 831 muestras de niños con LLA, en comparación con 1079 sin LLA (Xue *et al.*, 2019). Asimismo se reportado un aumento de miR-100 en muestras de LLA infantil con quimioresistencia a vincristina y daunorrubicina (Schotte *et al.*, 2011; de Oliveira *et al.*, 2012). También, se ha reportado que el aumento en la expresión de miR-125b, miR-99a y miR-100, se relaciona con la quimioresistencia a vincristina y que a su vez disminuyen la expresión de 11 genes (DNNT, NUCKS1, MALAT1, SNRPE, PN01, SET, KIF5B, PRPS2, RPS11, RPL38 y RPL23A) en LLA (Akbari *et al.*, 2013). El mRNA blanco seleccionado para miR-100 fue DNNT. DNNT es un gen localizado en el cromosoma 10q23-q25 (Isobe *et al.*, 1985), miembro de la familia DNA polimerasa tipo X que codifica para una DNA polimerasa de 58 kDa independiente de la plantilla que cataliza la adición de desoxinucleótidos al término 3'-hidroxilo de la cadena de oligonucleótidos (Coleman *et al.*, 1974). DNNT es considerado un gen clave en el desarrollo de células B, es por ello que normalmente se encuentra aumentado en medula ósea (Smith y Sigvardsson, 2004; Burger y Wiestner, 2018; Husen, 2009). Debido a que participa en la generación de receptores antigénicos mediante el proceso de recombinación de la adición de nucleótidos aleatorios en la unión (región

N) de la cadena pesada de Ig reordenada, durante recombinación de V (D) J en la maduración de las células B y T, jugando un papel muy importante en el desarrollo y variaciones de receptores antigénicos en el sistema inmune (Alt *et al.*, 1984; Motea y Berdis, 2010). Se ha propuesto el uso de DNTT para el diagnóstico y pronóstico de LLA (Olaniyi, 2011). Por tanto, DNTT puede ser un efectivo biomarcador para clasificar leucemias de origen linfoide, del mismo modo es valioso para definir las etapas de maduración de las leucemias (Onciu *et al.*, 2002). A pesar de no haber evidencia experimental de que sea un blanco directo de miR-100, sí existen datos de que un aumento en la expresión de miR-100 presenta un efecto en la disminución de DNTT (Akbari *et al.*, 2013). Asimismo, nosotros comprobamos a través de análisis *in silico* que DNTT presenta por lo menos dos sitios de interacción con miR-100 a través de RNAHybrid (Figura 5). En los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo se muestra un aumento de DNTT en las líneas celulares de LLA-B, en comparación con el cultivo primario de linfocitos (Figura 8). Estos resultados son similares a los obtenidos en la base de datos GEPIA, en donde se observa un aumento en la expresión de DNTT en muestras con LLA, en comparación sin LLA (Figura 6b). Adicionalmente, nosotros no detectamos a DNTT por western blot en el cultivo primario de linfocitos, pero sí en NALM6 y RS4; 11 (Figura 11). Greenwood y colaboradores en 1977., demostraron que hay mayor actividad de DNTT en muestras de médula ósea y sangre periférica de pacientes pediátricos diagnosticados con LLA y con recaída, en comparación con los que están en remisión u otros desordenes hematológicos y sin ninguna patología (Greenwood *et al.*, 1977). También han detectado blastos circulantes positivos con DNTT en 73 de 77 pacientes con LLA (Kung *et al.*, 1978). En 1978, se describe por primera vez un mayor porcentaje de expresión de DNTT en leucocitos de LLA de tipo B que en tipo T (Shaw *et al.*, 1978). En un estudio posterior evaluaron la actividad de DNTT en muestras de medula ósea y sangre periférica de pacientes con LMA, leucemia granulocítica crónica y en LLA, en donde demuestran un aumento en la actividad de DNTT en paciente con LLA (Yasmineh *et al.*, 1980). En sujetos con LLA-B expresan valores altos de DNTT, mientras que LMA, tuvo valores bajos (Farahat *et al.*, 1995). Recientemente se ha demostrado que la expresión de DNTT aumenta en presencia

de diferentes citocinas (IL-2, IL-7 y IL-7) en el cordón umbilical y que al inhibir a DNTT se reduce la expansión de células B y T, y por lo tanto disminuye la apoptosis y proliferación (Gholami *et al.*, 2017).

A pesar de que no se realizaron experimentos adicionales que demostraran totalmente la regulación de los miRNAs sobre sus blancos, se realizó la comparación de los perfiles de expresión a través de un análisis bioinformático (figura 9). En los datos tomados de leucemia linfocítica aguda pediátrica-Fase II (TARGET, 2018) se puede observar que cuando disminuye LEF1 aumenta miR-26b y viceversa. Del mismo modo se puede observar que cuando se presentan niveles altos de miR-100, se presenta una disminución en la expresión DNTT. Estos datos manifiestan una característica distintiva de los miRNAs, ya que exponen una correlación negativa con sus blancos. Sin embargo, faltaría realizar ensayos que demostraran esta regulación.

VII. CONCLUSIÓN

A pesar de que aún falta realizar experimentos suplementarios que evalúen el papel de miR-26b y miR-100 en LLA y su efecto en sus blanco, nuestros resultados sugieren que miR-26b puede tener funciones supresoras de tumor en LLA al mantener una expresión disminuida y favorecer la alta expresión de LEF1, uno de sus mRNA blanco, que es expresado en células pro-B y pre-B en condiciones normales, al igual que DNTT. Por otro lado, la expresión de miR-100 sugiere que podría estar participando como un oncomir en LLA, debido a que presenta un aumento en su expresión en NALM6 y RS4; 11, en comparación con el cultivo primario de linfocitos. Sin embargo, para DNTT no encontramos una correlación inversa con miR-100, pero hipotetizamos que se debe a que nuestras líneas celulares cuentan con características quimioresistentes y que existe una mayor expresión de DNTT, en comparación con miR-100 que no permite que sea totalmente regulado (Figura 12).

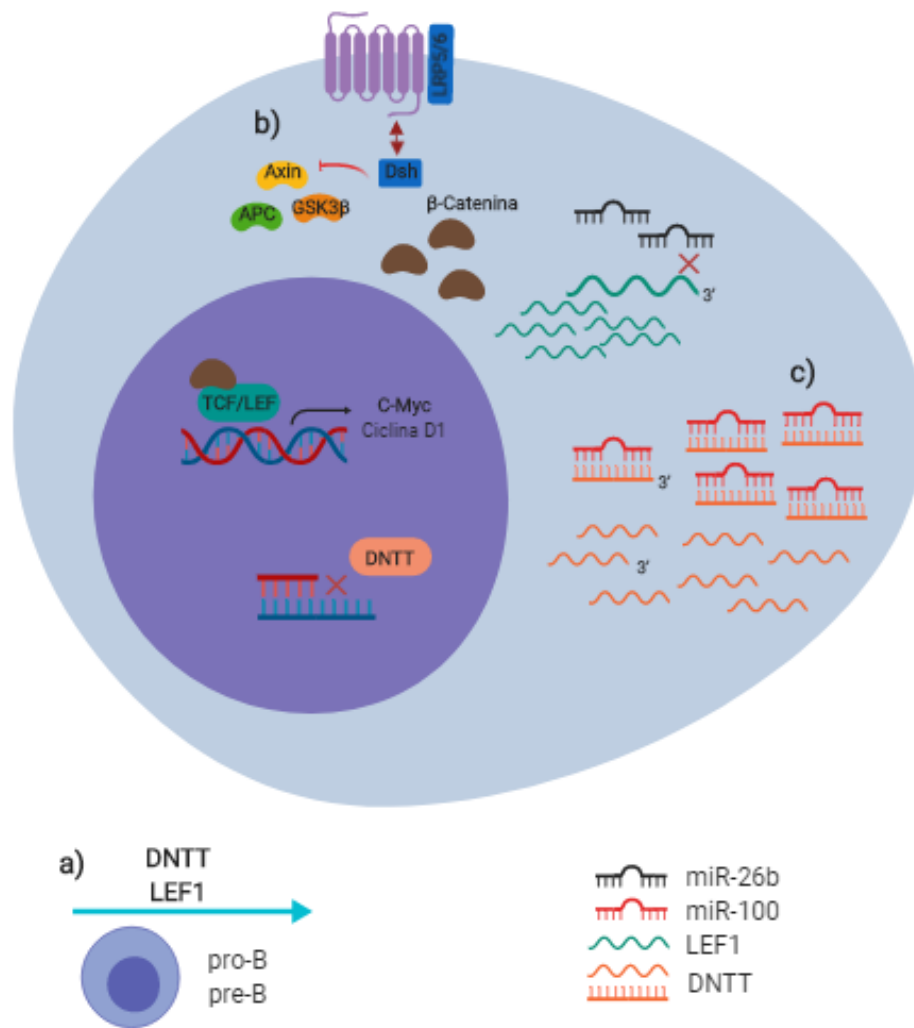


Figura 12. Posible mecanismo de miR-26b y miR-100 sobre LEF1 y DNNT en LLA-B. a) En condiciones normales la expresión de LEF1 y DNNT se encuentra únicamente en células pro-B y pre-B b) La disminución en la expresión de miR-26b favorece un aumento la expresión de LEF1, el cual está involucrado en la regulación de diferentes vías implicadas en la leucemogénesis. c) Debido a un aumento excesivo en la expresión de DNNT no está siendo regulado en su totalidad por miR-100 en blastos de LLA-B.

VIII. ANEXOS

Anexo No 1. Concentración e integridad del RNA.

Cuadro 1. Concentración y pureza del RNA en cultivo primario de linfocitos y líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda.

Muestras (Células)	Concentración de RNA ng/μl	Pureza A260/280
Nalm6	1721.4	1.74
	856.9	1.77
	8121.4	1.94
RS4;11	1499.3	1.73
	1210.8	1.72
	1720.6	1.86
Linfocitos	758.2	1.67
	627.5	1.74
	709.7	1.70

*A: Absorbancia

Debido a que la relación A260/280 no incluye datos de integridad, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

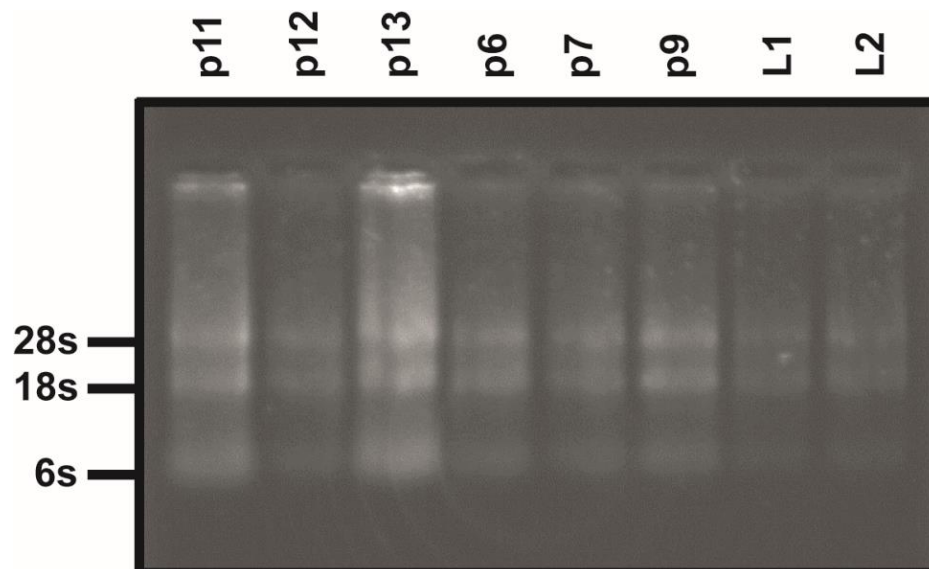


Figura 14. Integridad del RNA en las líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda y cultivo primario de linfocitos.

Anexo No. 2. Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de proteína, se realizó por el método de Bradford (BIORAD, No. de Cat. 500-0205). Para ello, se realizó una curva estándar utilizando como proteína de referencia Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Sigma, No. de Cat. A2153), leída a un espectro visible a una longitud de onda de 595 nm en el Nanodrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific).

	Blanco	St1	St2	St3	St4	St5
BSA	0 µl	2 µl	4 µl	6 µl	8 µl	10 µl
Agua Bidestilada	20 µl	18 µl	16 µl	14 µl	12 µl	10 µl
Reactivo de Bradford	180 µl	180 µl	180 µl	180 µl	180 µl	180 µl

Cuadro 2. Concentración de proteína de las líneas celulares en µg/µl por el método de Bradford.

Muestras	Concentración de proteína µg/µl
Nalm6	7.48
	5.33
	8.6
RS4;11	6.96
	4.8
	4.95
Linfocitos	4
	4.5
	4.45

IX. REFERENCIAS

1. Akbari, F., Lange-Turenhout, E., Aries, I., Pieters, R., den Boer, M. (2013) MiR-125b, miR-100 and miR-99a co-regulate vincristine resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 37: 1315-21.
2. Alt, F., Yancopoulos, G., Blackwell, T., Wood, C., Thomas, E., et al. (1984). Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *The EMBO Journal*. 3. 1209-1219.
3. Aly, R., y Yousef, A. (2015). Prognostic significance of lymphoid enhancer factor-1 expression in egyptian adult b-acute lymphoblastic leukemia patients. *Turkish journal of hematology*. 32. 15-20.
4. Bielora, B., Fisher, T., Waldman, D., Lerenthal, Y., Nissenkorn, A., Tohami, T., et al. (2013). Acute lymphoblastic leukemia in early childhood as the presenting sign of ataxia-telangiectasia variant. *Journal pediatric hematology and oncology*. 30. 574-582.
5. Bracken, C.B., Scott, H.S., Goodall, G.J. (2016). A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction. *Nature Review Genetics*. 1-14.
6. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72. 248-254.
7. Burger, J. y Wiestner, A. (2018). Targeting B cell receptor signalling in cancer: preclinical and clinical advances. *Nat Rev Cancer*. 18. 148-167.
8. Chessells, J., Harrison, G., Richards, S., Bailey, C., Hill, F., Hann, I. (2001). Downs syndrome and acute lymphoblastic leukaemia: clinical features and response to treatment. *Archives of disease in childhood*. 85. 321-325.
9. Coleman, M., Hutton, J., De Simone, J., Bollun, F. (1974). Terminal Deoxyribonucleotidyl Transferase in Human Leukemia. *PNAS*. 71. 4404-4408.
10. Crazzolara, R. y Bendall, I. (2009). Emerging treatments in acute lymphoblastic leukemia. *Current cancer drug targets*. 9. 19-31.
11. De Oliveira, J.C., Brassesco, M.S., Scrideli, C.A., Tone, L.G., Naredra, A. (2012). MicroRNA expression and activity in pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Pediatr blood cancer*. 59. 599-604.
12. Esquela-Kerscher, A., and Slack, F.J. (2006). Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 6. 259-269.
13. Farahat, N., Lens, D., Morilla, R., Matutes, E., Catovsky, D. (1995). Differential TdT expression in acute leukemia by flow cytometry: A quantitative study. *Leukemia* 9. 583-587.
14. Ferrado, A., Neuberg, D., Staunton, J., Lander, E., Golub, T., Look, T., et al. (2002). Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer cell*. 1. 75-87.
15. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. y Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nature*. 432. 235-240.
16. Fu, J., Si, L., Zhuang, Y., Zhang, A., Su, N., Li, D., et al. (2018). Wnt/ β -catenin inhibition reverses multidrug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Oncology reports*. 41. 1387-1394.
17. g
18. Gao, J., Aksoy, B., Dogrusoz, Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S., et al. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling*. 269. 1-19.
19. Gholami, S., Mohammadi, S., Movasaghpour, A., Abedelahi, A., Alihemmati, A., et al. (2017) Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) Inhibiti on of Cord Blood Derived B and T Cells Expansion. *Adv Pharm Bull*. 7. 215-220.
20. Godley, L., y Shimamura, A. (2017). Genetic predisposition to hematologic malignancies: management and surveillance. *Blood*. 130. 424-432.
21. Greenwood, M., Coleman, M., Hutton, J., Lampkin, B., Krill, C., Bollum, F., et al. (1977). Terminal deoxynucleotidyltransferase distribution in neoplastic and hematopoietic cells. *The journal of clinical investigation*. 59. 889-899.

22. Guo, X., Zhang, R., Liu, J., Li, M., Song, C., Dovat, S., Li, J., et al. (2015). Characterization of LEF1 high expression and novel mutations in adult acute leukemia. *PLoS One*. 10. E0125429.
23. Hovanec, K., Li, T., Waterman, M. (2000). The human LEF-1 gene contains a promoter preferentially active in lymphocytes and encodes multiple isoforms derived from alternative splicing. *Nucleic acids research*. 28. 1994-2003.
24. Huse, M. (2009). The T-cell-receptor signaling network. *J Cell Sci*. 122. 1269-73.
25. Iacobucci, I., Mullighan, G. (2017). Genetic basis of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical oncology*. 9. 975-983.
26. Isobe, M., Huebner, K., Erikson, J., Peterson, R., Bollum, F., et al. (1985) Chromosome localization of the gene for human terminal deoxynucleotidyltransferase to region 10q23-q25. *PNAS*. 82. 5836-5840.
27. Jimenez, J., Jang, G., Semler, B., Waterman, M. (2005). An internal ribosome entry site mediates translation of lymphoid enhancer factor-1. *RNA*. 11.1385-1399.
28. Jones, C., Gearheart, C., Fosmire, S., Delgado-Martin, C., Evensen, N., Bride, K., et al. (2015). MAPK signaling cascades mediate distinct glucocorticoid resistance mechanisms in pediatric leukemia. *Blood*. 126. 2202-2212.
29. Kotaki, R., Koyama-Nasu, R., Yamakawa, N., Kotani, A. (2017). miRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *International journal of molecular sciences*. 18. 1495-1506.
30. Kulshreshtha, R., Ferracin, M., Wojcik, S., Garzon, R., Alder, H., Agosto-Perez, F., et al. (2007). A microRNA signature of hypoxia. *Molecular and cellular biology*. 27. 1859-1867.
31. Kung, P., Long, J., Ratliff, R., Harrison, T., Baltimore, D. (1978). Terminal deoxynucleotidyl transferase in the diagnosis of leukemia and malignant lymphoma. *The american journal of medicine*. 64. 788-794.
32. Lazare, S.S., Wojtowicz, E.E., Bystrykh, L.V., de Haan, G. (2014). microRNAs in hematopoiesis. *Experimental Cell Research*. 329. 234-238.
33. Li, C., Gao, Y., Zhang, K., Chen, J., Han, S., Feng, B., et al. (2015). Multiple roles of MicroRNA-100 in human cancer and its therapeutic potential. *Cellular physiology and biochemistry*. 37: 2143-2159.
34. Li, X., Lou, X., Han, B., Duan, F., Wei, P., Chen, Y. (2013). MicroRNA-100/99a, deregulated in acute lymphoblastic leukemia, suppress proliferation and promote apoptosis by regulating the FKBP51 and IGF1R/mTOR signaling pathways. *British journal of cancer*. 109. 2189-2198.
35. Li, Y., Sun, Z., Liu, B., Shan, Y., Zhao, L., Li, J. (2017). Tumor-suppressive miR-26a and miR-26b inhibit cell aggressiveness by regulating FUT4 in colorectal cancer. *Cell death and disease*. 8. e2892-e2903.
36. Luan, C., Yang, Z., Chen, B. (2015). The functional role of microRNA in acute lymphoblastic leukemia: relevance for diagnosis, differential diagnosis, prognosis, and therapy. *OncoTargets and Therapy*. 8. 2903-2914.
37. Luis, T., Ichii, M., Brugman, M., Kincade, P., Staal, F. (2012). Wnt signaling strength regulates normal hematopoiesis and its deregulation is involved in leukemia development. *Leukemia*. 26. 414-421.
38. Luis, T., Naber, B., Roozen., Brugman, M., de Haas, E., Ghazvini, M., et al. (2011). Canonical Wnt signaling regulates hematopoiesis in a dosage-dependent fashion. *Cell stem cell*. 9. 345-356.
39. McBride, J.D., Liu, X., Berry, W.L., Janknecht, R., Cheng, R., Zhou, K., et al. (2017). Transgenic expression of canonical Wnt inhibitor, kallistatin, is associated with decreased circulating CD19+ B lymphocytes in the peripheral blood. *International Journal of Hematology*. 105. 748-757.
40. McBride, J.D., Liu, X., Berry, W.L., Janknecht, R., Cheng, R., Zhou, K., et al. (2017). Transgenic expression of canonical Wnt inhibitor, kallistatin, is associated with decreased circulating CD19+ B lymphocytes in the peripheral blood. *International Journal of Hematology*. 105. 748-757.
41. McWhiter, J.R., Neuteboom, S.T., Wancewicz, E.V., Monia, B.T., Downing, J.R., and Murre, C. (1999). Oncogenic homeodomain transcription factor E2A-Pbx1 activates a novel WNT gene in pre-B acute lymphoblastoid leukemia. *PNAS Immunology*. 96. 11464-11469.

42. Mi, S., Lu, J., Sun, M., Li, Z., Zhang, H., Neilly, M.B. (2007). MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *PNAS*. 104. 19971-19976.
43. Miyamoto, K., Seki, N., Matsushita, R., Yonemori, M., Yoshino, H., Nakagawa, M., et al. (2016). Tumor-suppressive miR-26a-5p y miR-26b-5p inhibit cell aggressiveness by regulating *PLOD2* in bladder cancer. *British journal of cancer*. 115. 354-363.
44. Motea, E., Berdis, A. (2010). Terminal deoxynucleotidyl transferase: the story of misguided DNA polymerase. *Biochimica et biophysica acta*. 1804. 1151-1166.
45. Mullighan, C. (2012). The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*. 2012. 389-396.
46. Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signaling. *Molecular Cell biology*. 13. 767-779.
47. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogénesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frotiers in Endocrinology*. 9. 1-12.
48. Olaniyi, J. (2011). Flow cytometric immunophotyping of hematological malignancies: the way forwars in Nigeria. *Pathology and laboratory medicine international*. 3. 17-24.
49. Oliveto, S., Mancino, M., Manfrini, N., Biffo, S. (2017). Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World Journal of Biological Chemistry*. 8. 45-56.
50. Onciu, M., Lorsbach, R., Charlene, E., Behm, F. (2002). Terminal Deoxynucleotidyl Transferase–Positive Lymphoid Cells in Reactive Lymph Nodes From Children With Malignant Tumors. *American Journal of Clinical Pathology*. 118. 248–254.
51. Petit, C., Gouel, F., Dubus, I., Heuclin, C., Roget, K., Vannier, J. (2016). Hypoxia promotes chemoresistance in acute lymphoblastic leukemia cell lines by modulating death signaling pathways. *BMC Cancer*. 16. 746-763.
52. Pillozzi, S., Masselli, M., De Lorenzo, E., Accordi, B., Cilia, E., Crociani, O., et al. (2011). Chemotherapy resistance in acute lymphoblastic leukemia requires hERG1 channels and is overcome by hERG1 blockers. *Blood*. 117. 902-914.
53. Pui, C-H., Robison, L., Look, T. (2009). Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 371. 1030-1043.
54. Qin, C., Huang, R-Y., Wang, Z-X. (2015). Potential role of miR-100 in cáncer diagnosis, prognosis, and therapy. *Tumor biology*. 36. 1403-1409.
55. Rupaimoole, R., Slack, F.J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature review drug discovery*. 1-19.
56. Schotte, D., de Menezes, R.X., Moqadam, F.A., Khankahdani, L.M., Lange-Turenhout, E., Chen, C., et al. (2011). MicroRNA characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Journal of the European Haematology Association Owned and published by the Ferrata Stori Foundation*. 96. 703-711.
57. Sehgal, S., Mujtaba, Gupta, D., Aggarwal, R., Marwaha, R. (2010). High incidence of Epstein Barr virus infection in childhood acute lymphocytic leukemia: a preliminary study. *Indian journal of pathology and microbiology*. 53. 63-67.
58. Shan, A., John, B., Sondhi, V. (2013). Acute lymphoblastic leukemia with treatment-naïve Fanconi anemia. *Indian pediatrics*. 50. 508-510.
59. Shaw, M., Dwyer, J., Allaudeen, H., Weitzman, H. (1978). Terminal Deoxyribonucleotidyl Transferase Activity in B-Cell Acute Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 51. 181-187.
60. Simioni, C., Zauli, G., Martelli, A., Vitale, M., Ultimo, S., Milani, D., et al. (2018). Physical training interventions for children and teenagers affected by acute lymphoblastic leukemia and related treatment impairments. *Oncotarget*. 9. 17199-17209.
61. Smith, E and Sigvardsson, M. (2004). The roles of transcription factors in B lymphocyte commitment, development, and transformation. *Journal of leukocyte biology*. 75. 973-979.
62. Spector, L., Robison, L., Bhatia, S. (2013). Epidemiology and etiology childhood leukemias, 2nd edition. Cambridge university press, pp 48-66.
63. Svoronos, A., Engelman, D., Slack, F. (2016). OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of microRNAs in Cancer. *Cancer Research*. 13. 3666-3670.
64. Tang, Z., Li, C., Kang, B., Gao, G., Cheng, L., Zhang, Z. (2017). GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic acids research*. 45. W98-W102.

65. Terwilliger, T., and Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood cancer journal*. 7. E577.
66. Tiemessen, M., Baert, M., Sconewille, T., Brugman, M., Famili, F., Salvatori, D., et al. (2012). The nuclear effector of Wnt-signaling, Tcf1, functions as a T-cell-specific tumor suppressor for development of lymphomas. *Plos biology*. 10. E1001430.
67. Wang, J., Yu, M., Guan, S., Zhang, G., Wang, J., Cheng, Y. (2017). Prognostic significance of microRNA-100 in solid tumor: an updated meta-analysis. *Oncotargets and therapy*. 10. 493-502.
68. Wang, S., Nan, k., Wang, Y., Wang, W., Tian, T. (2012). The balance between two isoforms of LEF1 regulates colon carcinoma growth. *BMC gastroenterology*. 12. 53-64.
69. Wang, Y., Sun, B., Sun, H., Zhao, X., Wang, X., Zhao, N., et al. (2016). Regulation of proliferation, angiogenesis and apoptosis in hepatocellular carcinoma by miR-26b-5p. *Tumor biology*.
70. Wu, N., Zhao, X., Liu, M., Liu, H., Yao, W., Zhang, Y., et al. (2011). Role of microRNA-26b in glioma development and its mediated regulation of EphA2. *PLos one*. 6. e16264-e16275.
71. Xue, Y., Yang, X., Hu, S., Kang, M., Chen, J., Fang, Y. (2019). A genetic variant in miR-100 is a protective factor of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer medicine*. 8. 2553-2560.
72. Yasmineh, W., Smith, B., Bloomfield, C. (1980). DNA nucleotidyltransferase of normal persons and leukemic patients. *Clinical Chemistry* 26. 891-895.
73. Yeh, C.H., Moles, R., Nicot, C. (2016). Clinical significance of microRNAs in chronic and acute human leukemia. *Molecular cancer*. 15. 37-53.
74. Yu, S., Zhou, X., Steinke, F.C., Liu, C., Chen, S-C, et al. (2012). The TCF-1 and LEF-1 transcription factors have cooperative and opposing roles in T cell development and malignancy. *Immunity*. 37. 813-826.
75. Yuan, T., Yang, Y., Chen, J., Li, W., Li, W., Zhang, Q., et al. (2017). Regulation of PI3K signaling in T cell acute lymphoblastic leukemia: a novel PTEN/Ikaros/miR-26b mechanism reveals a critical targetable role for PIK3CD. *Leukemia*. 31. 2355-2364.
76. Zhan, T., Rindtorff, N., Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene*. 36. 1461-1473.
77. Zhang, H., Luo, X.Q., Zhang, P., Huang, L.B., Zheng, Y.S., Wu, J., et al. (2009). MicroRNA patterns associated with clinical prognostic parameters and CNS relapse prediction in pediatric acute leukemia. *PloS one*. 4.e7826
78. Zhang, Z., Kim, K., Li, X., Moreno, M., Sharp, T., Goodheart, M., et al. (2014). MicroRNA-26b represses colon cancer cell proliferation by inhibiting lymphoid Enhancer factor 1 expression. *Molecular cancer therapeutics*. 13. 1942-1951.
79. Zhang, Z., Kim, K., Li, X., Moreno, M., Sharp, T., Goodheart, M.J., Safe, S., et al. (2014). MicroRNA-26b represses colon cancer cell proliferation by inhibiting lymphoid enhancer factor 1 expression. *Molecular cancer therapeutics*. 13. 1942-1951.
80. Zheng, Y.S., Zhang, H., Zhang, X.J., Feng, D.D., Luo, X.Q., Zeng, C.W., et al. (2012). MiR-100 regulates cell differentiation and survival by targeting RBSP3, a phosphatase-like tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 31. 80-92.