

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

“Evaluación preliminar del nivel de expresión relativa del microARN exosomal miR-21 a partir de plasma sanguíneo como potencial biomarcador del cáncer gástrico”

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORAS:

Cedrón Maguña, Vania Marisa

Gonzales Gómez, Emely Melissa

ASESOR:

Dr. Azañero Díaz, Carlos Alberto

CO-ASESORES:

M.Sc. Salvatierra Alor, Max

Dr. Diaz Plasencia, Juan Alberto

Nuevo Chimbote, Perú

2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

“Evaluación preliminar del nivel de expresión relativa del microARN exosomal miR-21 a partir de plasma sanguíneo como potencial biomarcador del cáncer gástrico”

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORAS:

Cedrón Maguiña, Vania Marisa (ORCID: 0000-0002-4153-2519)

Gonzales Gómez, Emely Melissa (ORCID: 0000-0002-4341-1016)

ASESOR:

Dr. Azañero Díaz, Carlos Alberto (ORCID: 0000-0002-5612-4104)

CO-ASESORES:

M.Sc. Salvatierra Alor, Max (ORCID: 0000-0002-8190-9288)

Dr. Diaz Plasencia, Juan Alberto (ORCID: 0000-0001-7019-6609)

Nuevo Chimbote, Perú

2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**“Evaluación preliminar del nivel de expresión relativa del microARN
exosomal miR-21 a partir de plasma sanguíneo como potencial
biomarcador del cáncer gástrico”**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

Revisado y Aprobado por el Asesor y Co-asesores:

Dr. Azañero Díaz, Carlos Alberto
ASESOR

DNI: 18093785

ORCID: 0000-0002-5612-4104

M.Sc. Salvatierra Alor, Max
CO-ASESOR

DNI: 45565363

ORCID: 0000-0002-8190-9288

Dr. Diaz Plasencia, Juan Alberto
CO-ASESOR

DNI: 17867164

ORCID: 0000-0001-7019-6609

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



UNS
UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL SANTA

**“Evaluación preliminar del nivel de expresión relativa del microARN
exosomal miR-21 a partir de plasma sanguíneo como potencial
biomarcador del cáncer gástrico”**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

Revisado y Aprobado por el Jurado Evaluador:

Dr. Capa Robles, Willian Robert
PRESIDENTE

DNI:32969285
ORCID: 0000-0003-3402-613X

Mg. Alpaca Salvador, Hugo Aurelio
SECRETARIO

DNI: 18212554
ORCID: 0000-0002-6805-6786

Dr. Azañero Díaz, Carlos Alberto
INTEGRANTE

DNI: 18093785
ORCID: 0000-0002-5612-4104

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en la Aula Multimedia de Escuela de Posgrado siendo las 15:00 horas del día 12/05/23, dando cumplimiento a la Resolución N° 135-2023-UNS-FC se reunió el Jurado Evaluador presidido por Dr. William Capa Robles, teniendo como miembros a Dr. Hugo Alperca Salvador (secretario) (a), y Dr. Carlos Azañero Díaz (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de Licenciado en Biotecnología realizado por el, (la), (los) tesista (as) Vanía Marisa Cedrón Maguina Emely Melissa Gonzales Gomez, quien (es) sustentó (aron) la tesis intitulada:

Evaluación preliminar del nivel de expresión relativa del microARN exosomal miR-21 a partir de plasma sanguíneo como potencial biomarcador de Cáncer gástrico

Terminada la sustentación, el (la), (los) tesista (as)s respondió (ieron) a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como Ex. elente asignándole un calificativo de 19 puntos, según artículo 111° del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 580-2022-CU.-R-UNS)

Siendo las 16:10 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad

Ch.
Nombre: William Capa Robles
Presidente

H.A.
Nombre: Hugo Alperca Salvador
Secretario

C.A.
Nombre: Carlos Azañero Díaz
Integrante

Distribución: Integrantes J.E (), tesistas () y archivo (02).



DEDICATORIA

A Dios, por bendecirnos y darnos las fortalezas necesarias para culminar esta tesis luego de este largo tiempo, incluyendo la pandemia del Covid-19.

A nuestros padres por ser nuestro apoyo incondicional desde el momento en que llegamos a sus vidas hasta el día de hoy en el que culminamos esta investigación para obtención del título profesional.

A nuestros hermanos por su enorme cariño y apoyo constante, así como a todos nuestros demás familiares quiénes celebran nuestros logros.

A todas las personas que en este momento se encuentran atravesando por una enfermedad tan complicada como lo es el cáncer gástrico, a ellas y de manera muy especial a las personas que participaron voluntariamente de este estudio y a sus familias, quienes los acompañan en este doloroso proceso albergando esperanzas de que todo mejore; porque todas ellas son la razón principal por el que nuestros ideales profesionales están orientados hacia la investigación en ciencias de la salud. Con mucho respeto, dedicamos este trabajo de investigación y nuestros futuros esfuerzos a todas estas personas, incluyendo a las que ya no nos acompañan en vida.

AGRADECIMIENTOS

A la UNS, por el financiamiento otorgado para la ejecución de nuestra Tesis, adquirido mediante el “Concurso de Tesis Título Profesional-2019”, el cual fue promovido por el Vicerrectorado de Investigación (VRIN).

Al Dr. Carlos Azañero Díaz, docente de la UNS y nuestro Asesor, por el apoyo y motivación constante durante los momentos difíciles y sui generis que se suscitaron a lo largo de la ejecución de nuestra tesis; al igual que por sus consejos y recomendaciones durante el desarrollo de nuestra investigación.

Así también, un especial agradecimiento al M.Sc. Max Salvatierra Alor, nuestro co-asesor y amigo, por la orientación constante, sus recomendaciones, su disponibilidad de tiempo y la paciencia brindada durante la ejecución de nuestra tesis y la revisión de nuestro trabajo final.

Al Dr. Juan Alberto Díaz Plasencia, médico cirujano oncólogo del IREN-Norte y co-asesor de nuestra tesis, por el apoyo brindado durante nuestras actividades de colección de muestras de sangre de los pacientes con cáncer gástrico en el IREN-Norte, por su tiempo y orientación con aspectos relacionados al cáncer gástrico y las historias clínicas de los pacientes.

A la Dra. Eliana Zelada Mazmela, Jefa del *Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción* de la UNS, por permitarnos desde el primer momento ejecutar nuestra Tesis en sus instalaciones; así como, por su comprensión y paciencia a pesar de todos los contratiempos que tuvimos durante la ejecución de nuestra tesis. Así también, al equipo de investigación y técnicos responsables de dicho laboratorio, especialmente al Blgo. Eduardo Reyes y al Bach. Luis Santos, quienes nos apoyaron en el desarrollo de diversos ensayos realizados.

A la Ing. Korey y la Ing. Greca, técnicos responsables del *Laboratorio de Calidad y del Laboratorio de Bioprocesos*, respectivamente, del Instituto de Investigación Tecnológico Agroindustrial (IITA), por su apoyo durante nuestras actividades dentro de dichos laboratorios.

A Walter, nuestro amigo y técnico responsable del *Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica*, por su apoyo durante el desarrollo de nuestras actividades de tesis en dicho laboratorio.

A los técnicos enfermeros del Departamento de Abdomen del IREN-Norte por su cordialidad y apoyo durante las fechas que realizamos los muestreos en dicha institución.

Finalmente, nuestro enorme agradecimiento a todas las personas que participaron del estudio y nos dieron su consentimiento y confianza para coleccionar sus muestras e información personal para el desarrollo de este estudio.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xiii
I. INTRODUCCIÓN	14
1.1. OBJETIVOS	18
1.1.1. OBJETIVO GENERAL	18
1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
1.2. DEFINICIÓN CONCEPTUAL Y OPERACIONAL DE VARIABLES	19
1.2.1. VARIABLES	19
1.2.2. DEFINICIÓN CONCEPTUAL	19
1.2.3. DEFINICIÓN OPERACIONAL	20
II. MARCO TEÓRICO.....	21
2.1. CÁNCER GÁSTRICO	21
2.1.1. ESTRUCTURA ANATOMICA Y FUNCIONAL DEL ESTÓMAGO	21
2.1.2. TIPOS DE CÁNCER GÁSTRICO.....	23
2.1.3. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER GÁSTRICO	23
2.1.4. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DEL CG	26
2.2. BIOMARCADORES	27
2.3. microARNs:.....	28
2.3.1. BIOGÉNESIS Y FUNCIÓN	28
2.3.2. MECANISMOS DE SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	30
2.3.3. microARNs CIRCULANTES	31
2.3.4. EL ROL DE miR-21 EN EL CÁNCER GÁSTRICO	36
2.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE microARNs MEDIANTE TÉCNICA DE RT-qPCR.....	37
2.4.1. ASPECTOS BÁSICOS DE LA RT-qPCR	37
2.4.2. MÉTODOS BASADOS EN LA RT-qPCR PARA EL ANÁLISIS DE microARNs	40
2.5. VARIABLES PRE-ANALÍTICAS	43
2.5.1. HEMÓLISIS Y SU EFECTO EN EL ANÁLISIS DE MICROARNs	43
III. MATERIALES Y MÉTODOS	44
3.1. DISEÑO Y PARTICIPANTES DEL ESTUDIO	44
3.1.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	44
3.1.2. TIPO DE MUESTREO	44

3.1.3.	TAMAÑO DE LA MUESTRA	45
3.1.4.	CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD DE LOS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO.....	45
3.1.5.	MUESTRA.....	46
3.2.	SEPARACIÓN DEL PLASMA SANGUÍNEO Y EVALUACIÓN DEL GRADO DE HEMÓLISIS	49
3.3.	AISLAMIENTO DE EXOSOMAS Y EXTRACCIÓN DE microARNs EXOSOMALES A PARTIR DE PLASMA SANGUÍNEO	50
3.4.	AMPLIFICACIÓN DE MICROARNs MEDIANTE RT-qPCR Y DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN RELATIVA DE miR-21 EXOSOMAL PLASMÁTICO ASOCIADO AL CG	55
3.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	57
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
4.1.	DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PARTICIPANTES	58
4.2.	ESTANDARIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN DEL PLASMA SANGUÍNEO Y EVALUACIÓN DEL GRADO DE HEMÓLISIS.....	60
4.3.	ESTANDARIZACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS PARA EL AISLAMIENTO DE EXOSOMAS Y EXTRACCIÓN DE microARNs EXOSOMALES A PARTIR DE PLASMA SANGUÍNEO.	63
4.4.	EXTRACCIÓN DE microARNs EXOSOMALES PARA EL ANÁLISIS DE miR-21 EXOSOMAL A PARTIR DE PLASMA SANGUÍNEO	68
4.5.	AJUSTE DE PARÁMETROS PARA AMPLIFICACIÓN DE microARNs MEDIANTE RT-qPCR.....	70
4.6.	NIVEL DE EXPRESIÓN RELATIVA DE miR-21 EXOSOMAL ASOCIADO AL CG, MEDIANTE RT-qPCR.	74
V.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	79
5.1.	CONCLUSIONES.....	79
5.2.	RECOMENDACIONES.....	79
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
VII.	ANEXOS	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Definición operacional de las variables de estudio	20
Tabla 2: Parámetros según protocolo del Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit.....	52
Tabla 3: Parámetros modificados del protocolo Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit	53
Tabla 4: Parámetros de amplificación de microARNs mediante RT-qPCR.....	56
Tabla 5: Características demográficas y clínicas de los participantes	59
Tabla 6: Puntaje de inspección visual y concentración de oxi-hemoglobina en plasma sanguíneo obtenido bajo diferentes velocidades de centrifugación	63
Tabla 7: Cuantificación de ARNs pequeños exosomales totales obtenidos en la etapa de estandarización del protocolo Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit	67
Tabla 8: Cuantificación de ARNs pequeños exosomales totales de muestras del grupo control y de pacientes con cáncer gástrico.....	69
Tabla 9: Valores de Ct y T° de Melting de los productos o amplicones de RT-qPCR a partir de una muestra de ADNc concentrada o diluida.	72
Tabla 10: Valores de CT y T° de Melting de los productos o amplicones de RT-qPCR, empleando diferentes parámetros de amplificación en la etapa de hibridación	73
Tabla 11: Expresión relativa de miR-21 exosomal plasmático y su relación con las características clinicopatológicas de los pacientes con CG	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:Partes del estómago	22
Figura 2: Capas del estómago	22
Figura 3: Clasificación macroscópica del cáncer gástrico.	25
Figura 4: Ruta canónica de la biogénesis de los microARNs	29
Figura 5: Mecanismos de silenciamiento de la expresión génica por microARNs	31
Figura 6: Mecanismos de transporte de los microARNs	33
Figura 7: Estructura y contenido de un exosoma.....	34
Figura 8: Secreción de exosomas por célula cancerígena	35
Figura 9: Representación de una curva de amplificación ilustrando las nomenclaturas comúnmente empleadas en la RT-qPCR	39
Figura 10: Método de RT-qPCR basado en la poliadenilación.....	42
Figura 11: Diagrama de flujo de la etapa de estandarización.	47
Figura 12: Diagrama de flujo de la determinación del nivel de la expresión relativa del microARN miR-21 exosomal plasmático en PC en comparación con los IS.....	48
Figura 13: Concentración de oxi-hemoglobina (mg/dL) según la velocidad de centrifugación (RCF) usada para la separación de plasma sanguíneo	62
Figura 14: Amplificación de Controles Negativos de miR-21 y miR-16 mediante RT-qPCR, empleando 0.375 µL de colorante de referencia diluido a 300 nM por reacción..	71
Figura 15: Tasa del nivel de expresión relativa promedio de miR-21 exosomal asociado al CG..	75

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: CLASIFICACIÓN DE ESTADIOS DE CÁNCER GÁSTRICO SEGÚN TNM...103	
ANEXO 2: FICHA CLÍNICA DE REGISTRO DE PARTICIPANTES105	
ANEXO 3: CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACION EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN107	
ANEXO 4: PRUEBA PARA ESTANDARIZACIÓN DE SEPARACIÓN DE PLASMA A PARTIR DE SANGRE HUMANA ENDOVENOSA.....108	
ANEXO 5: PROTOCOLO DEL TOTAL EXOSOME ISOLATION (FROM PLASMA) KIT109	
ANEXO 6: PROTOCOLO MODIFICADO DEL TOTAL EXOSOME RNA AND PROTEIN ISOLATION KIT.....111	
ANEXO 7: PROTOCOLO DEL miRNA 1st-strand cDNA SYNTHESIS KIT115	
ANEXO 8: RESULTADOS DE VALORES DE CT Y CURVA DE MELTING OBTENIDOS MEDIANTE RT-qPCR.....117	
ANEXO 9: TABLA DEL PROCESAMIENTO DE DATOS PARA DETERMINAR LOS NIVELES DE EXPRESIÓN RELATIVA DE miR-21 EXOSOMAL PLASMÁTICO119	
ANEXO 10: MIGRACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PRODUCTOS DE RT-qPCR120	
ANEXO 11: REGISTRO FOTOGRÁFICO.....121	

ABREVIATURAS

CG:	Cáncer Gástrico
PC:	Paciente con cáncer gástrico
IS:	Individuos Sanos
TNM:	Tumor, Nódulos linfáticos y Metástasis distante (Sistema de clasificación del CG)
ARN:	Ácido Ribonucleico
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
miARN:	MicroARN maduro
c-miARN:	MicroARN circulante
ADNc:	ADN complementario
RT-qPCR:	Transcripción Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real Cuantitativa
Ct:	Ciclo umbral
ng/μL:	nanogramos por microlitro
Abs:	Absorbancia

RESUMEN

El cáncer gástrico (CG) es una enfermedad neoplásica considerada la primera causa de muerte por cáncer en mujeres y hombres en el Perú. Uno de los enfoques actuales para reducir esta tasa de mortalidad es el desarrollo de nuevas metodologías de diagnóstico, ya que las tradicionales son invasivas y brindan diagnósticos tardíos. Se conoce que la aparición y progresión del CG así como de otras neoplasias puede deberse a cambios en el perfil de microARNs, los cuales participan en la regulación pos-transcripcional de la expresión génica. Algunos de ellos han sido propuestos con una alta expectativa para ser nuevos biomarcadores de pronóstico, diagnóstico e inclusive blancos terapéuticos del CG. Diferentes investigaciones han determinado que el microARN miR-21 puede ser transportado mediante exosomas en diversos fluidos corporales de forma circulante, relacionándolo además con algunos tipos de cáncer; sin embargo, su relación con el CG ha sido poco estudiado, además, no se han reportado estudios que analicen los niveles de expresión de miR-21 exosomal en plasma sanguíneo.

En la presente investigación evaluamos de forma preliminar el nivel de expresión relativa del miR-21 exosomal plasmático como potencial biomarcador no invasivo asociado al CG. Para ello se estandarizó y optimizó el protocolo de extracción de microARNs exosomales obteniéndose concentraciones de ARNs pequeños exosomales totales mayores de 14.6 ng/uL, así como el protocolo de amplificación de microARNs mediante la técnica Transcripción Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real Cuantitativa (RT-qPCR) en el cual se obtuvieron valores de Ct en congruencia con la abundancia reportada de los microARNs miR-21 y miR-16 (control endógeno). Posteriormente, se determinó el nivel de expresión relativa promedio del miR-21 exosomal plasmático en pacientes con CG (PC), los resultados mostraron una sobreexpresión significativa en PC en comparación con los individuos sanos (IS) (PC vs. IS, 11.184 vs. 1.104, $P = 0.0043$).

Finalmente, teniendo en cuenta la naturaleza preliminar del estudio, se reporta el primer hallazgo del microARN miR-21 exosomal en plasma como posible biomarcador no invasivo para la detección del CG, además de métodos estandarizados para su replicación en nuevos estudios, lo que abre la oportunidad de desarrollar e implementar una herramienta no invasiva para el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades recurrentes en nuestro país con la finalidad de reducir la mortalidad que tanto el CG y otras enfermedades ocasionan.

PALABRAS CLAVES: Cáncer gástrico, microARN, miR-21, exosomas, plasma, RT-qPCR

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer gástrico (CG) es una enfermedad neoplásica considerada la quinta neoplasia maligna más común en el mundo y la cuarta causa de muerte por cáncer en ambos sexos, esta situación es más crítica en el Perú siendo el país de la región más afectado por esta enfermedad, ya que es el tercero más común y la primera causa de muerte por cáncer (Sung et al., 2021). En este contexto, es preciso mencionar que además de los factores de riesgo de esta enfermedad que conllevan a su alta incidencia en países en vías de desarrollo (Karimi et al., 2014), los síntomas del CG tienden a emerger tarde, por lo que el diagnóstico tradicional suele darse mayormente en etapas avanzadas, por tanto las opciones de tratamiento son a menudo limitadas, es así que se conoce que la tasa de supervivencia a 5 años en cánceres avanzados es solo de un 5 a 20% (Piazuelo & Correa, 2013).

En cuanto a los métodos de diagnóstico y pronóstico tradicionales para el CG se destacan la biopsia endoscópica, la cual es una prueba sumamente invasiva y requiere de un operador altamente calificado (Wang et al., 2022; Zhou et al., 2015). Esta técnica se basa en la identificación y el análisis microscópico de la lesión (tumor), por lo que se requiere varias tomas de muestra durante la endoscopia para que el diagnóstico sea certero (Choi et al., 2012; Hale et al., 2015; Nishitani et al., 2019); además, debido a ello existen riesgos de hemorragia y perforación (Choi et al., 2012; Ricci et al., 2007). Así también, este procedimiento genera impactos a nivel psicológico ya que, se ha reportado que la ansiedad previa a la endoscopia es relativamente alta entre los pacientes lo que eventualmente puede hacer que los pacientes eviten realizarse la endoscopia (Behrouzian et al., 2017).

Bajo este contexto, uno de los enfoques para reducir la alta tasa de mortalidad es el desarrollo de nuevas metodologías de diagnóstico, las cuales pueden generarse gracias a los avances en la investigación y tecnología de alto rendimiento permitiendo una mayor comprensión de los aspectos moleculares de la patogénesis del CG. La gran mayoría de los cánceres gástricos surgen esporádicamente sin un componente hereditario demostrable, solo menos del 3% de los casos de CG están asociados a síndromes hereditarios (Serenio et al., 2011). Se conoce entonces que el CG se genera mayoritariamente a partir de interacciones complejas entre factores de riesgo ambientales y factores genéticos que contribuyen a la aparición esporádica y progresión de este. Algunas anomalías genéticas adquiridas pueden ser el resultado de la insuficiencia

cromosómica, la inestabilidad de microsatélites, mutaciones genéticas somáticas, polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en genes candidatos claves o de cambios en el perfil epigenético o del perfil de microARNs (miARNs) que regulan la expresión génica. Todos estos mecanismos pueden dar lugar a vías de señalización desreguladas, interacciones alteradas entre el huésped y el medio ambiente, interrupción del ciclo celular, del crecimiento y proliferación; así como, características modificadas de la apoptosis celular que favorece el desarrollo del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011).

Es así como se ha venido identificando y evaluando nuevos biomarcadores o moléculas biológicas medibles cuyos valores son relevantes para el pronóstico y diagnóstico temprano del CG. Entre ellos se encuentran los biomarcadores clásicos, que se emplean cotidianamente, como el antígeno sérico carcinoembrionario (CEA) (Tatsuta et al., 1980) y el antígeno sérico carbohidrato 19-9 (CA 19-9) (Szymendera, 1986), pero que se ha demostrado que poseen baja especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de esta enfermedad (entre 25-45%) (Schneider & Schulze, 2003); hasta microARNs propuestos recientemente con una alta expectativa para ser nuevos biomarcadores de pronóstico, diagnóstico e inclusive blancos terapéuticos del CG (Tsai et al., 2016).

Estos microARNs, son ARNs no codificantes, de tamaño pequeño (18 a 27 nucleótidos) que, en su forma madura, regulan negativamente la expresión de genes mediante la inhibición traduccional o la degradación exonucleolítica del ARNm uniéndose a su región 3' no traducida (UTR); y dependiendo de los ARNm blancos, ambos mecanismos resultarán en la reducción del nivel de proteínas y en un profundo efecto sobre la homeostasis celular (Di Leva & Croce, 2010; Sekar et al., 2016; Wang, 2013)

Estas pequeñas moléculas son sujetos clave en el desarrollo de diferentes enfermedades como el cáncer, ya que participan en casi todos los aspectos de patogénesis y progresión tales como proliferación, apoptosis, invasión/metástasis y angiogénesis; llegando a actuar como supresores de tumores u oncogenes, jugando un rol muy activo en los procesos oncogénicos (Ventura & Jacks, 2009); por lo tanto, es vital el estudio del perfil de expresión de miARN el cual ha demostrado una asociación importante con los resultados clínicos de la enfermedad, lo que sugiere el uso de miARNs como biomarcadores para ayudar a identificar pacientes de alto riesgo y, de ese modo, ayudar a orientar las decisiones de tratamiento (Winther et al., 2015).

Uno de los primeros y más prevalentes miARNs, identificados en células humanas y otros mamíferos, es el microARN-21 (miR-21), el cual es altamente conservado y ha sido estudiado en diversas enfermedades incluyendo el cáncer (Krichevsky & Gabriely, 2009; Wu et al., 2015). En estudios realizados en células *in vitro*, la expresión aberrante de miR-

21 fue capaz de acelerar la proliferación celular, migración, invasión, intravasación y metástasis (Lu et al., 2008; Xu et al., 2014); procesos altamente críticos y definitorios de la agresividad del cáncer, razón por el cual es conocido como un miARN oncogénico (oncomir); mientras que por el contrario su silenciamiento o supresión, conduce a la inhibición de todos estos procesos y a la inducción de apoptosis celular (Zhou et al., 2018) demostrando así el rol fundamental del miR-21. Por otro lado, se ha reportado que este miR oncogénico es frecuentemente sobreexpresado en carcinomas hepatocelulares (Amr et al., 2016), linfomas difusos de células B grandes (Gohar et al., 2018) y en tumores provenientes de diversos tipos de tejidos incluyendo pulmón (Du et al., 2021), mama (Wang et al., 2019), colon (You et al., 2019), próstata (Guan et al., 2016), ovario (Chan et al., 2014), cuello uterino (Deng et al., 2022) y estómago (Jiang et al., 2018).

Por otro lado, como parte del proceso de comunicación celular, algunos de estos microARNs se liberan y pueden encontrarse de forma circulante en fluidos corporales, lo cual facilita la disponibilidad del análisis no invasivo del mismo siendo fundamental para el desarrollo de herramientas de diagnóstico rápidas y precisas (Cui et al., 2019; Schwarzenbach, 2014).

Es conocido que los microARNs circulantes también pueden estar empaquetados en microvesículas o exosomas provenientes de una fusión con la membrana celular de las células de origen (Zhang et al., 2015). Estos exosomas son vesículas entre 30 a 150 nm de diámetro presentes en todos los fluidos corporales (Kalra et al., 2016), los cuales contienen principalmente proteínas, lípidos, ADN, ARNm y miARNs (Penforis et al., 2016; Ramachandran & Palanisamy, 2012).

Los microARNs exosomales frecuentemente pueden ser liberados por las mismas células tumorales y actuar como mediadores en los procesos de comunicación celular, conduciéndose a otras células cercanas al microambiente tumoral y tener la capacidad de influir en el fenotipo de la célula receptora, reprogramando el transcriptoma celular (Bell & Taylor, 2016), motivo por el cual en los últimos años se ha dado realce al estudio de los microARNs exosomales como biomarcadores más precisos para el pronóstico del cáncer, ya que juegan un rol importante en la progresión, la estimulación de la angiogénesis y la formación facilitada de metástasis del cáncer (Zhang, 2015).

Diferentes investigaciones han determinado que el microARN miR-21 puede ser transportado mediante exosomas, y han evaluado el valor pronóstico de miR-21 exosomal en diversos tipos de cáncer tales como: cáncer hepático, esofágico, pancreático y colorectal (Cui et al., 2019; Liao et al., 2016; Tsukamoto et al., 2017; Wang et al., 2014). En relación al CG, existen pocos estudios realizados de este microARN exosomal, uno

de ellos ha evaluado la expresión de miR-21 exosomal en el líquido de lavado peritoneal y de ascitis maligna, encontrando una alta expresión en estos tipos de fluidos y asociándolos con un fenotipo peritoneal pre-metastásico en CG (Tokuhisa et al., 2015). Así mismo, se ha analizado a miR-21 exosomal plasmático pero en pacientes con cáncer gástrico que tuvieron resección curativa R0 (extirpación del cáncer sin dejar enfermedad macroscópica ni microscópica residual) con y sin recurrencia peritoneal, encontrando claras diferencias entre ambos grupos y demostrando el rol potencial del miR-21 exosomal como biomarcador de recurrencia peritoneal (Soeda et al., 2019). Por otro lado, en cuanto a estudios realizados en fluidos sanguíneos, no se han reportado los niveles de expresión de miR-21 exosomal en plasma sanguíneo, solo un único estudio reportó un nivel de expresión de miR-21 significativamente mayor en los exomas séricos de pacientes con CG a comparación del grupo control de individuos sanos (IS), así como, la asociación de su alta expresión con una variedad de factores clínicopatológicos adversos y un mal pronóstico de los pacientes (You et al., 2020).

En Latinoamérica el estudio de los microARNs asociados a enfermedades humanas es un campo poco explorado, una de estas investigaciones realizada con pacientes brasileños reporta un panel de microARNs asociado al cáncer de mama triple negativo (Sugita et al., 2019). Por otro lado, en Chile se ha investigado su relación con la respuesta a fármacos para el tratamiento de la hipercolesterolemia como factor de riesgo a enfermedades cardiovasculares (Leal et al., 2021; Ubilla et al., 2021). En el Perú, de igual manera existen pocas investigaciones que giran en torno a la evaluación de microARNs en enfermedades como la diabetes mellitus tipo 2 (Bernal, 2018), neurocisticercosis (Aguirre & Giraldez, 2017), tuberculosis (Yareta et al., 2020), cáncer de mama (Motta, 2020) y cáncer gástrico (Cedrón, 2017). Además, en cuanto a investigaciones sobre los niveles de expresión de miR-21 y su relación con el CG en México se ha reportado un estudio donde concluyen que miR-21, miR-25 y miR-223 en plasma pueden servir como una potencial herramienta no invasiva en la detección de CG, ya que observaron que los niveles de expresión fueron significativamente sobre regulados en los dos primeros y el último de ellos regulado negativamente en los pacientes con CG en comparación a los controles (Cuellar-Gomez et al., 2021). En el Perú solo se ha reportado hasta la fecha un único estudio de microARNs en CG, el cual encontró una aparente sobreexpresión significativa de los microARNs oncogénicos miR-21 (en suero y plasma), miR-106b y let-7a (en suero) en pacientes con CG respecto al grupo control (Cedrón, 2017).

Por todo lo expuesto, el objetivo general de la presente investigación fue evaluar el nivel de expresión relativa del microARN exosomal miR-21 a partir de plasma sanguíneo como potencial biomarcador del cáncer gástrico, de forma preliminar. Para ello se

estandarizaron, en primer lugar, los protocolos de extracción de microARNs circulantes exosomales para optimización de los procesos y obtención de una mayor concentración de microARNs. Posteriormente se estandarizaron los métodos para la amplificación de microARNs específicos, que se realizó mediante la técnica Transcripción Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real Cuantitativa (RT-qPCR), la cual es considerada la prueba estándar de oro para la detección de microARNs debido a la sensibilidad y especificidad de la misma (Hunt et al., 2015; Schmittgen et al., 2008), siendo una de las más empleadas para el análisis de expresión de los microARNs (Forero et al., 2019; Kotlarek et al., 2018), sobre todo para la identificación de microARNs exosomales (You. et al., 2020), así como circulantes a partir de plasma o suero como posibles biomarcadores del CG (Li et al., 2012; Shiotani et al., 2013; Wu et al., 2015).

Una vez estandarizados los métodos para la extracción y amplificación de microARNs, se determinó el nivel de la expresión relativa del microARN miR-21 exosomal plasmático en pacientes con CG, siendo una de las primeras evaluaciones de microARNs exosomales en pacientes peruanos con CG, en especial obteniéndolo a partir de plasma sanguíneo, y de esta manera contribuir de forma preliminar a definirlo como un biomarcador potencial no invasivo para diagnóstico del CG; cabe mencionar además que el reporte de metodologías estandarizadas para el estudio de nuevos microARNs es también un aporte de conocimientos muy importante para el mundo científico, ya que es un punto de avance para el establecimiento de estudios a gran escala que puedan conducir a una mejor consideración de la importancia clínica de los microARNs circulantes evaluando su sensibilidad y especificidad para el diagnóstico clínico de pacientes con CG, lo cual promovería mayores opciones de tratamiento para contribuir con la mejora de la sobrevida a largo plazo y calidad de vida de los pacientes.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar de forma preliminar el nivel de expresión relativa del microARN exosomal miR-21 a partir de plasma sanguíneo como potencial biomarcador del cáncer gástrico.

1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar los métodos para extracción y amplificación de microARNs exosomales a partir de plasma sanguíneo.
- Determinar el nivel de la expresión relativa del microARN miR-21 exosomal plasmático en pacientes con cáncer gástrico en comparación con los individuos sanos.

1.2. DEFINICIÓN CONCEPTUAL Y OPERACIONAL DE VARIABLES

1.2.1. VARIABLES

- **Variable X (independiente):** Cáncer gástrico
- **Variable Y (dependiente):** Nivel de expresión relativa de miR-21 exosomal plasmático
- **Variable Z (interveniente):** Muestra de ARN exosomal obtenida

1.2.2. DEFINICIÓN CONCEPTUAL

- **Variable X:** Cáncer gástrico
Enfermedad neoplásica localizada en el estómago.
- **Variable Y:** Nivel de expresión relativa de miR-21 exosomal plasmático
Cantidad inicial de expresión de miR-21 de un paciente con CG con respecto a un IS, obtenida por cuantificación relativa mediante qPCR.
- **Variable Z:** Muestra de ARN exosomal obtenida
Muestra de ARN exosomal, conformado por ARNs pequeños totales extraído de cada participante a partir de plasma sanguíneo.

1.2.3. DEFINICIÓN OPERACIONAL

Tabla 1: Definición operacional de las variables de estudio

Variables	Dimensiones	Indicadores	Escala de medición
Cáncer gástrico	<u>Tipo de cáncer gástrico:</u>	-Tomografía computarizada de abdomen (TAC)	-Temprano o precoz -Avanzado
	-Adenocarcinoma intestinal -Adenocarcinoma difuso	-Endoscopia superior y diagnostico histológico de biopsia.	
	Estadificación de cáncer gástrico	- <u>TNM</u> : Sistema de estadificación comúnmente utilizado para el CG	- T (tamaño de tumor): 0-4 - N (propagación a ganglios linfáticos adyacentes): 0-3 - M (propagación a sitios distantes): M0 o M1
		- <u>Borrmann</u> : Clasificación de acuerdo con sus características macroscópicas	- Estadio del I al IV
		- <u>Lauren</u> : Clasificación de acuerdo con sus características microscópicas.	- Intestinal - Difuso
Nivel de expresión relativa de miR-21	Nivel de expresión relativa de miR-21 exosomal en pacientes con CG	- <u>Valor CT</u> : Número de ciclo en el cual la señal de fluorescencia cruza la línea umbral. Este valor hace referencia de manera inversamente proporcional a la cantidad inicial del ADNc de interés. - <u>Cuantificación relativa</u> : mide los cambios en el estado basal de un gen de interés versus un gen de expresión constante que actúa como control o referencia.	-Sobreexpresión -Baja expresión
Muestra de ARN exosomal obtenida	ARN pequeños exosomales totales	Concentración de ARN	ng/μL

II. MARCO TEÓRICO

2.1. CÁNCER GÁSTRICO

El cáncer de estómago es una enfermedad que permite la formación de células malignas en la mucosa gástrica y que comienzan a crecer e infiltrar en forma descontrolada de manera vertical en las capas del estómago, según el sumario de la base de datos integral del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos. Este cáncer se forma por complejas interacciones genéticas y ambientales (factores de riesgo) que contribuyen a su iniciación y progresión (McLean & El-Omar, 2014).

2.1.1. ESTRUCTURA ANATOMICA Y FUNCIONAL DEL ESTÓMAGO

Para entender un poco más acerca de este tipo de cáncer es preciso entender la estructura normal y el funcionamiento del estómago. El estómago es un órgano ubicado en la parte superior del abdomen. Es parte del aparato digestivo, que procesa parcialmente los alimentos y comienza a digerirlos al mezclarlos con jugos digestivos convirtiéndolos en líquido diluido. Su funcionamiento inicia cuando los alimentos pasan al estómago a través de un tubo muscular y hueco que se llama esófago, que se une al estómago en la unión gastroesofágica, la cual está justo debajo del diafragma (la capa fina del músculo de respiración situado debajo de los pulmones), posteriormente los alimentos y el jugo gástrico segregado se mezclan y se vacían luego en la primera sección del intestino delgado llamada duodeno (Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos - NCI, 2022). El estómago tiene 5 partes (Figura 1), el área proximal se encuentra inmediatamente debajo del diafragma y se denomina cardias. Las porciones restantes son el fondo y el cuerpo del estómago, y la porción distal del estómago se conoce como antro. El píloro es un anillo muscular que controla el flujo de los contenidos ingeridos desde el estómago hacia la primera porción del duodeno. El estómago tiene así también dos curvas, que forman los bordes internos y externos, los cuales se conocen como curvaturas menor y mayor, respectivamente (Amin et al., 2017).

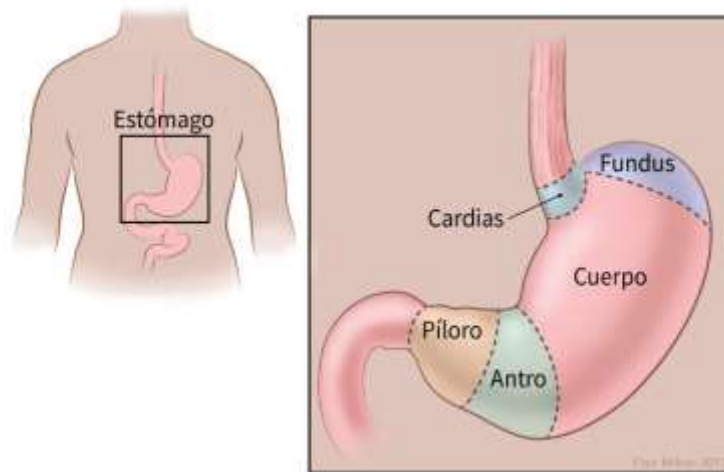


Figura 1:Partes del estómago

Nota. Tomado de la Sociedad Americana contra el Cáncer (2017)

Histológicamente, la pared del estómago tiene cinco capas: mucosa, submucosa, muscular, subserosa (tejido conjuntivo) y serosa (Figura 2) (Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos - NCI, 2022). El reconocimiento de estas capas es importante para determinar la etapa (extensión) del cáncer y de esta manera ayudar a determinar el pronóstico de una persona.

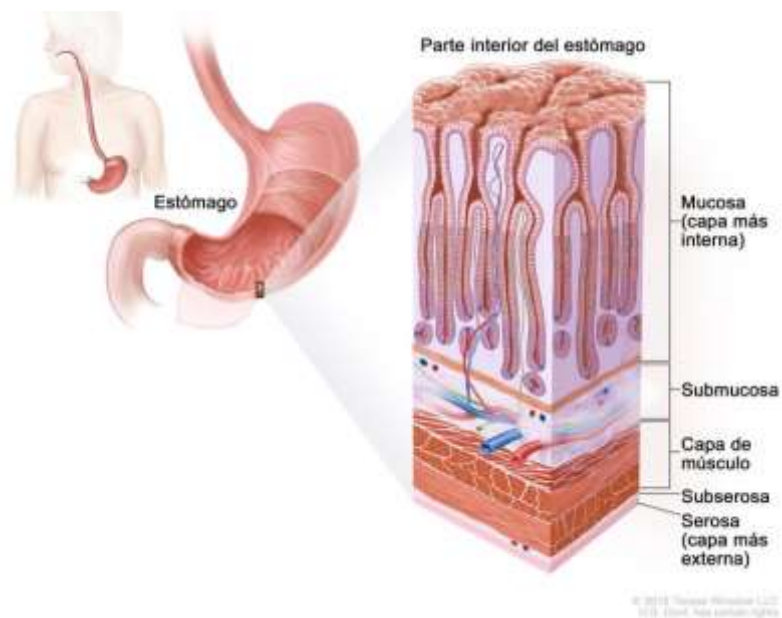


Figura 2: Capas del estómago

Nota. Tomado de Capas de la Pared del Estómago de Terese Winslow, 2018, U.S. Government.LLC

2.1.2. TIPOS DE CÁNCER GÁSTRICO

El cáncer gástrico comienza comúnmente en la mucosa y a medida que crece se disemina a las otras capas del estómago, a este tipo se le denomina adenocarcinoma, que es el tipo histológico más frecuente de los casos totales con el 90 % aproximadamente (García C., 2013; Karimi et al., 2014). Otros tipos histológicos de menor incidencia son los linfomas, los sarcomas, los tumores del estroma gastrointestinal (GIST), los tumores neuroendocrinos y los melanomas (Amin et al., 2017).

Cuando se habla de cáncer gástrico se hace referencia, en general, al adenocarcinoma gástrico. Los adenocarcinomas se pueden dividir en subtipos generales, según la clasificación de Lauren: intestinal y difuso son los principales (Lauren, 1965), más el subtipo tipo indeterminado como variante poco común (Hwang et al., 2010). Estos subtipos tienen diferentes perfiles moleculares y sus vías de desarrollo son distintas (McLean & El-Omar, 2014). Por ejemplo, el cáncer gástrico de tipo intestinal generalmente surge de un cambio gástrico premaligno, como gastritis atrófica seguida de metaplasia intestinal y displasia, que además comúnmente se desarrolla sobre un fondo inflamatorio crónico que generalmente es inducido por una infección por *H. pylori* (Correa, 1995). En cambio, el cáncer gástrico difuso no parece surgir de esta progresión neoplásica escalonada, sino que surge de la mucosa gástrica normal sin etapa premaligna definitiva, el cáncer gástrico difuso es asociado con características patológicas como pérdida de cohesión celular y células en anillo de sello (Yakirevich & Resnick, 2013). Además, se lo relaciona con menores influencias ambientales, por lo que se asocia con un estado negativo de *H. pylori*, por otro lado se observa con mayor frecuencia en mujeres y personas jóvenes, además de estar asociados con un peor pronóstico (Piazuelo & Correa, 2013).

2.1.3. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER GÁSTRICO

Se han propuesto varios sistemas de clasificación, por diversos autores para ayudar a la descripción del cáncer gástrico o más específicamente de los adenocarcinomas, ya sea a través de características macroscópicas, como la clasificación Borrmann o basada en su visualización microscópica como la clasificación de Lauren que está entre los más utilizados. Así mismo, se pueden clasificar por estadiaje o también puede ser mediante clasificación histológica. En cuanto a la clasificación por estadiaje, se pueden clasificar en

temprano y avanzado por un lado y según el sistema TNM por otro (Espejo & Navarrete, 2003). En cuanto a la clasificación histológica, pueden ser también la descrita por Lauren, la cual ya se ha descrito previamente.

1. Clasificación por Estadaje

Este hace referencia con la extensión del tumor y su aspecto macroscópico se clasifican en:

➤ Cáncer Temprano

El cáncer gástrico temprano se define como un carcinoma invasivo presente en la mucosa y/o submucosa, con o sin metástasis en los ganglios linfáticos, independientemente del tamaño del tumor (Japanese Gastric Cancer Association, 2011). La mayoría de los carcinomas gástricos tempranos son pequeños, miden de 2 a 5 cm (Hu et al., 2012). A este tipo de cáncer se le clasifica tal como se puede observar en la Figura 3a siguiendo la clasificación endoscópica de París (American Society for Gastrointestinal Endoscopy, 2003). En general, el pronóstico del carcinoma gástrico temprano es excelente, con una tasa de supervivencia a los 5 años entre 85 a 100% (Piazuelo & Correa, 2013).

➤ Cáncer Avanzado

El cáncer gástrico avanzado invade el músculo también conocido como muscularis propria o más allá, lo cual conlleva un pronóstico mucho peor que el cáncer temprano, con una tasa de supervivencia a los 5 años de alrededor del 5 al 20% (Piazuelo & Correa, 2013). El aspecto macroscópico de los carcinomas gástricos avanzados puede ser exofítico, ulcerado, infiltrante o combinado (Hu et al., 2012). Según la clasificación de Borrmann (Figura 3b), la apariencia macroscópica de los carcinomas gástricos avanzados se puede dividir en tipo I (1) para crecimiento polipoide, tipo II (2) para crecimiento fúngico, tipo III (3) para crecimiento ulceroso y tipo IV (4) para crecimiento infiltrante difuso, que también se conoce como linitis plástica cuando la mayor parte de la pared gástrica está involucrada por células tumorales infiltrantes.

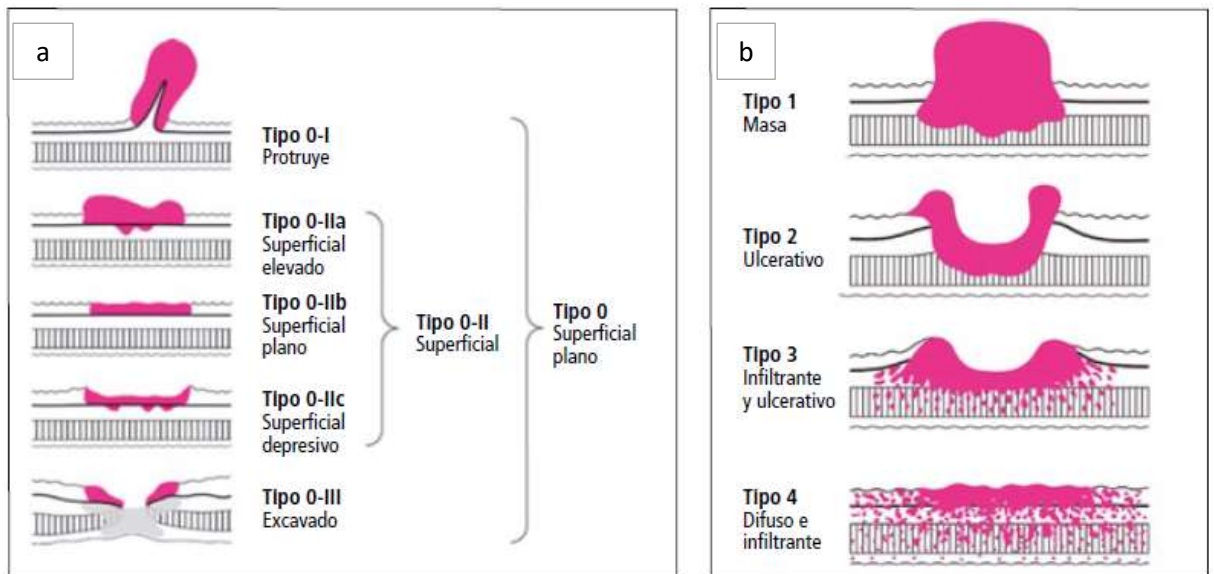


Figura 3: Clasificación macroscópica del cáncer gástrico. (a) *Cáncer gástrico temprano* y (b) *Cáncer gástrico avanzado, con la clasificación Borrmann.* Nota. Tomado de Garcia (2013)

➤ Clasificación por TNM

El sistema de estadificación que se emplea con más frecuencia para el cáncer de estómago es el sistema TNM del American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Amin et al., 2017), el cual se basa en tres piezas clave de información: La extensión (tamaño) del tumor (T), conocer si el cáncer ha alcanzado las estructuras u órganos cercanos, la propagación a los ganglios (nódulos) linfáticos adyacentes (N) y la propagación (metástasis) a sitios distantes (M). El sistema AJCC empleado es el que entró en vigor desde enero del 2018. Este sistema permite clasificar por etapas a todos los cánceres de estómago excepto aquellos que se originan en la unión gastroesofágica (donde el esófago y el estómago se unen) o que se originan en el cardias (la primera parte del estómago) y crecen hacia la unión gastroesofágica (Amin et al., 2017).

Los números y las letras después de la TNM proporcionan más detalles sobre cada uno de estos factores. Los números más altos significan que el cáncer está más avanzado. Una vez que se han determinado las categorías T, N y M de una persona, esta información se combina en un proceso llamado agrupación por etapas para asignar una etapa general, el sistema de estadificación en la tabla que sigue es el estadio clínico se basa en la

evidencia de la extensión de la enfermedad presente antes de que se instituya la terapia. Incluye examen físico, pruebas de laboratorio, imágenes radiológicas, endoscopia (que posiblemente incluya ultrasonografía endoscópica [EUS] con aspiración con aguja fina [FNA] para evaluación citológica) y biopsia (para confirmación histológica), y puede incluir laparoscopia diagnóstica con lavados peritoneales para evaluación citológica/histológica (ANEXO 1) (Amin et al., 2017).

2.1.4. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DEL CG

La tasa de supervivencia depende de la etapa del cáncer gástrico en el momento del diagnóstico. En Japón, se encontró que la tasa de supervivencia era de alrededor del 50 %, mientras que en los países occidentales la supervivencia a los 5 años osciló entre el 5 y el 20 % debido al diagnóstico tardío (Hochwald et al., 2000). Un requisito previo para reducir la mortalidad y mejorar el tratamiento en pacientes con cáncer gástrico es la detección temprana y el seguimiento de la dinámica del tumor (Park et al., 2014).

En la actualidad, las técnicas más empleadas para el diagnóstico del CG son la endoscopia, así como la biopsia endoscópica (Zhou et al., 2015). La endoscopia digestiva alta es el estándar de oro para el diagnóstico de CG, sin embargo es un procedimiento invasivo, la cual genera estrés además que existe un riesgo pequeño de hemorragia y perforación, con una mortalidad reportada del 0,0008% y una morbilidad del 0,43% (Ricci et al., 2007), esto tiene relación con las múltiples muestras de biopsia que se deben obtener para que el diagnóstico sea más preciso, este paso implica el muestreo repetido en el mismo sitio del tejido, de modo que cada biopsia subsiguiente penetre más profundamente en la pared gástrica (Jelski & Mroczko, 2022), es por ello que el éxito de la evaluación endoscópica depende en gran medida de las habilidades del endoscopista y de su capacidad para detectar cambios muy sutiles en la mucosa (Aida et al., 2008).

Después de establecer el diagnóstico inicial de cáncer gástrico, es necesaria una evaluación adicional de metástasis para determinar las opciones de tratamiento (Layke & Lopez, 2004). La tomografía computarizada (TC) es un método útil para detectar metástasis hepáticas mayores de 5 mm de diámetro, afectación perigástrica, siembra peritoneal y afectación de otras estructuras

peritoneales (p. ej., ovarios, plataforma rectal). Sin embargo, la tomografía computarizada no puede permitir la evaluación de la diseminación del tumor a los ganglios linfáticos adyacentes a menos que estén agrandados. Además, no se ha demostrado que sea eficaz para permitir la determinación de la profundidad de la invasión tumoral y no puede respaldar de forma fiable la detección de metástasis solitarias de hígado o pulmón de menos de 5 mm de diámetro (Ziegler et al., 1993).

2.2. BIOMARCADORES

Los biomarcadores son características que se evalúan y se miden objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales o patológicos o de la respuesta farmacológica a una terapia (Matsuoka & Yashiro, 2018). Así también el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (2022), lo describe como molécula biológica que se encuentra en la sangre, otros líquidos o tejidos del cuerpo, y cuya presencia es un signo de un proceso normal o anormal, de una afección o de una enfermedad. También se les suele llamar marcadores biológicos o moleculares.

Los biomarcadores suelen detectarse utilizando una “biopsia líquida” para pacientes con GC, como es la sangre. Este procedimiento es menos invasivo que la biopsia endoscópica o quirúrgica, permite la detección más temprana de la enfermedad y el seguimiento del desarrollo del tumor gástrico, así como la resistencia a la quimioterapia y la efectividad del tratamiento. Los marcadores tumorales séricos se aplican ampliamente en el diagnóstico, la evaluación del efecto del tratamiento y el control de la enfermedad (Jelski & Mroczko, 2022). Los marcadores tumorales comúnmente utilizados son el antígeno carcinoembrionario (CEA), el antígeno carbohidrato (CA 19-9) y el antígeno carbohidrato 72-4 (CA 72-4). Sin embargo, ninguno de ellos demuestra un alto nivel de precisión diagnóstica, ya que carecen de sensibilidad y especificidad detectándose ocasionalmente en situaciones benignas y en distintos tipos de cáncer. En concordancia, Schneider & Schulze (2003) reportaron una baja especificidad y sensibilidad para el diagnóstico de CG (entre 25-45%) del CA 19-9 y el CEA. De ahí el gran interés en la búsqueda de nuevos biomarcadores sensibles y específicos, que permitan detectar cambios neoplásicos tempranos y dar un diagnóstico inicial del cáncer (Healy et al., 2012).

Investigaciones recientes como el análisis del genoma para identificar biomarcadores de CG han resultado en el descubrimiento de una amplia variedad de

moléculas como el ADN, el ARN, proteínas y otras formaciones celulares como los exosomas (Jelski & Mroczko, 2022; Matsuoka & Yashiro, 2018) relacionadas al cáncer, dentro de ellas resaltan el ADN libre de células circulantes que se originan a partir de células normales o cancerosas identificables en el suero; las células tumorales circulantes (CTC) que son células liberadas del tumor primario al sistema vascular que circulan en el torrente sanguíneo; los autoanticuerpos contra antígenos asociados a tumores (AAT) que también se encuentran en la sangre, importantes en la predicción del cáncer en etapa temprana; vesículas extracelulares (VE) derivadas del cáncer que son vesículas pequeñas, como los exosomas, que están rodeadas por una bicapa lipídica que se liberan desde tejidos cancerosos en este caso, hacia el espacio extracelular y los microARNs circulantes, que son los que detallaremos a continuación.

2.3. microARNs:

Los microARNs son pequeñas moléculas de ARN no codificantes, altamente conservadas, de aproximadamente 15 a 27 nucleótidos de longitud; que en su forma madura (conocidos como miARNs), regulan negativamente la expresión de genes mediante la inhibición traduccional o la degradación exonucleolítica del ARNm uniéndose a su región 3' no traducida (UTR); y dependiendo de los ARNm blancos, ambos mecanismos resultarán en la reducción del nivel de proteínas y en un profundo efecto sobre la homeostasis celular (Di Leva & Croce, 2010; Sekar et al., 2016; Wang, 2013). De manera importante, un solo gen puede ser regulado por múltiples miARNs; y del mismo modo, un único miARN podría tener más de un objetivo debido a la correspondencia imperfecta entre el miARN y su objetivo (Hashimoto et al., 2013).

2.3.1. BIOGÉNESIS Y FUNCIÓN

La biogénesis de los miARNs es un proceso que involucra múltiples pasos, todos los microARNs son madurados y procesados mediante la intervención de diferentes enzimas y proteínas, comenzando en el núcleo celular y finalizando en el citoplasma. La mayoría de los genes de miARNs se encuentran en regiones intergénicas o en orientación antisentido de ciertos genes, los cuales contienen sus propios promotores y elementos reguladores. Sin embargo, hasta una cuarta parte de los genes de miARNs son intrónicos y comparten sus promotores con sus genes huésped (Wu et al., 2010). La

biogénesis de los miARNs ha sido caracterizada ampliamente, esta ruta biogénica es conocida como canónica (Figura 4) y depende estrictamente de la actividad de las enzimas Drosha y Dicer, y de la proteína DGCR8; por otro lado, también existen rutas alternativas (no canónicas) por las cuales se originan miARNs independientes de la intervención de Drosha/DGCR8 o Dicer (Saliminejad et al., 2019).

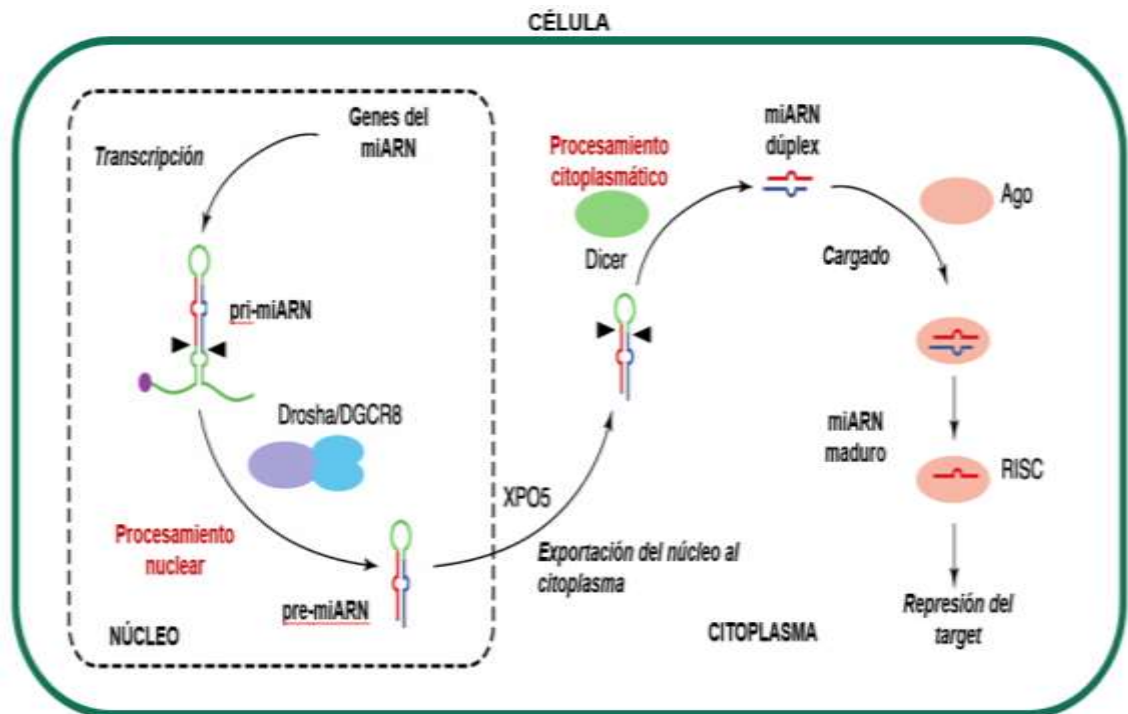


Figura 4: Ruta canónica de la biogénesis de los microARNs

Nota. Adaptado de Matsuyama & Suzuki (2020)

La biogénesis de los miARN inicia con la transcripción de los genes de miARNs por la ARN polimerasa II (ARNasa II) en el núcleo, obteniendo microARNs primarios (pri-miARN) de doble cadena, con una caperuza 5' (cap -5') y una cola poliadenilada Poli(A) en el extremo 3'. Estos pri-miARN pueden ser de varios cientos de nucleótidos y de naturaleza monocistrónica o policistrónica, siendo capaz de contener hasta siete estructuras "stem-loop" o también conocido como "hairpin loop", que darán lugar finalmente a diferentes miARNs maduros (Bhaskaran & Mohan, 2014; Wu et al., 2010).

Posteriormente, los pri-miARNs son procesados por un complejo multiproteínico llamado Microprocesador conformado por la enzima Drosha, una ARN polimerasa III (ARNasa III) y su cofactor DGCR8, obteniéndose

microARNs precursores de doble cadena, de aproximadamente 60 a 100 nucleótidos llamados pre-microARNs (pre-miARN) los cuales han sido privados de la cap-5', la cola poli(A) y de secuencias que flanquean la estructura "hairpin loop". Los pre-miARNs son transportados fuera del núcleo hacia el citoplasma por la Exportina-5 (XPO5), donde son degradados por la enzima Dicer, otra ARNasa III, obteniéndose miARNs dúplex de aproximadamente 20 a 25 nucleótidos. Este dúplex, está conformado por una cadena guía madura y una cadena pasajera. El miARN dúplex es desenrollado por una helicasa activa, y subsecuentemente el miARN maduro de una sola hebra se une al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) que incluye a la proteína Argonauta (AGO) denominándose de esta manera como complejo miRISC, mientras que la hebra pasajera es degradada; sin embargo, en algunos casos la hebra pasajera puede también volverse funcional (Bhaskaran & Mohan, 2014; Matsuyama & Suzuki, 2020).

Finalmente el miARN maduro guía al complejo miRISC hasta su ARNm blanco y reprime su traducción o en algunos casos lo degrada (Bhaskaran & Mohan, 2014; Wu et al., 2010).

2.3.2. MECANISMOS DE SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Una vez que el miARN maduro guía al complejo miRISC hacia su ARNm diana, el miARN se unen a una secuencia específica en la región no traducida del extremo 3' (3'UTR) de su ARNm diana para inducir la represión traduccional, la desadenilación y decapitación del ARNm diana o su degradación (Figura 5). Por otro lado, también se han detectado sitios de unión del miARN en otras regiones del ARNm, incluida la región no traducida del extremo 5' (5'UTR) y la secuencia codificante, así como dentro de las regiones promotoras. La unión del miARN al 5' UTR y a las regiones codificantes tiene efectos de silenciamiento en la expresión génica, mientras que la interacción del miARN con la región promotora induce la transcripción (Gulyaeva & Kushlinskiy, 2016; Saliminejad et al., 2019).

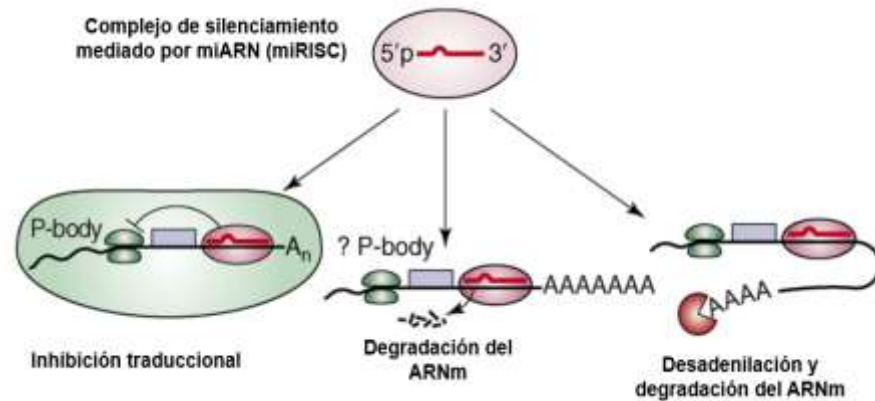


Figura 5: Mecanismos de silenciamiento de la expresión génica por microARNs

Nota. Adaptado de Zhao & Srivastava (2007)

La complementariedad del miARN guía con su ARNm diana puede ser perfecta o casi perfecta, los ARNm diana pueden ser cortados y degradados o de lo contrario se reprime su traducción. Para que el corte ocurra, el miRISC debe contener una proteína Argonauta (AGO) capaz de realizar un corte endonucleotídico, en el caso de los mamíferos es la proteína AGO2 la que se asocia formando el complejo miRISC. La mayoría de miARNs de animales tienen complementariedad imperfecta con sus ARNm diana a diferencia de las plantas, por lo que se promueve su represión traduccional en lugar de la escisión y la degradación (Cai et al., 2009; Gulyaeva & Kushlinskiy, 2016; Saliminejad et al., 2019). Estos mecanismos de regulación de la expresión génica generan la desestabilización y/o disminución de los niveles del ARNm diana, lo cual conduce a su vez a niveles reducidos de proteínas y por consiguiente, a profundas consecuencias en la homeostasis celular (Bhaskaran & Mohan, 2014; Dong et al., 2013).

2.3.3. microARNs CIRCULANTES

Los microARNs circulantes (c-miARN), microARNs circulantes libres de células o también llamados microARNs extracelulares, son aquellos microARNs que han sido liberados por diferentes tipos de células hacia el medio extracelular, estas células pueden ser de tipo apoptóticas, necróticas o tumorales (Pozniak et al., 2022); así mismo, debido a que los microARNs están involucrados en muchas vías celulares, es probable que una proporción de los c-miARN se deriven también de células sanguíneas y otros tejidos como

resultado de los procesos de comunicación celular y la regulación inmunitaria ampliamente activos (Schwarzenbach, 2014). Una vez secretados al espacio extracelular estos pueden llegar a diferentes tipos de fluidos corporales, tales como el líquido cefaloraquídeo (Machida et al., 2013), orina (Mall et al., 2013), saliva (Gallo & Alevizos, 2013) y derivados de la sangre como suero y plasma (Kroh et al., 2010).

Por otro lado, los c-miARNs se caracterizan por permanecer altamente estables a pesar de la presencia de ribonucleasas endógenas en los diferentes fluidos corporales, y de manera especial en el plasma y suero sanguíneo; así también son muy resistentes a altas temperaturas, diferentes condiciones de almacenamiento, niveles de pH y ciclos de congelación y descongelación (Chen et al., 2008; Mitchell et al., 2008). Por consiguiente, son gracias a estas características que se plantea su posible utilidad como biomarcadores para el diagnóstico o pronóstico de diferentes enfermedades de manera no invasiva.

a) Mecanismos de transporte (estabilización) de los microARNs circulantes

Existen dos mecanismos ampliamente descritos por el que los c-miARN pueden circular de manera estable en los fluidos corporales (Figura 6), el primero de ellos es formando complejos de unión con proteínas de la familia Argonauta (ribonucleoproteína) como Argonout 2 (AGO2), o también con lipoproteínas de alta densidad (HDL). El segundo mecanismo, es a través de la encapsulación de los miARNs en vesículas extracelulares (VE) tales como los exosomas, microvesículas o cuerpos apoptóticos (Cui & Shu, 2020; Sohel, 2016).

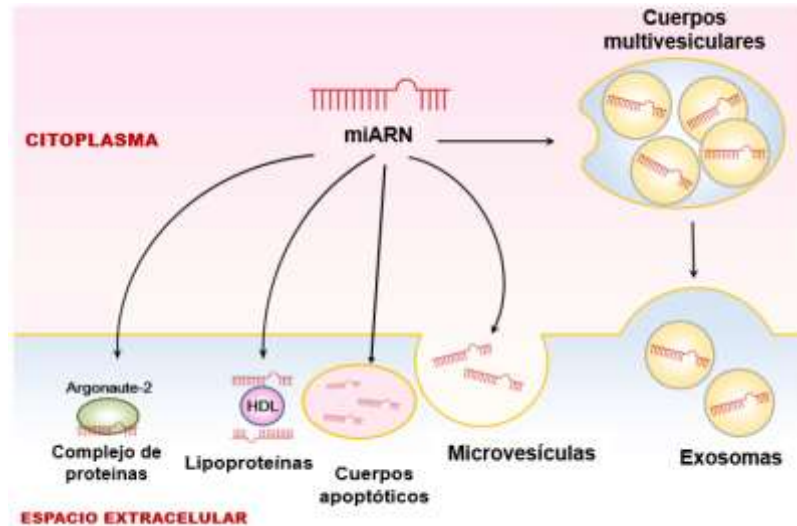


Figura 6: Mecanismos de transporte de los microARNs

Nota. Adaptado de Lee et al. (2015)

b) Vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares (VE) son una familia de partículas/vesículas las cuales son liberadas por las células, están delimitadas por una bicapa lipídica similar a la de la membrana plasmática celular (Zaborowski et al., 2015). Las VE están presentes en la sangre y los fluidos corporales, transportando una variedad de moléculas que pueden jugar un rol importante en la comunicación celular influyendo en la función de la célula receptora, modulando procesos celulares cruciales como la homeostasis, la inducción/amortiguación de la inflamación y la promoción de la reparación (Fernández-Messina et al., 2015; Yáñez-Mó et al., 2015).

Existen 3 tipos principales de VE, las microvesículas (MV) o ectosomas, los exosomas y los cuerpos apoptóticos, los cuáles se diferencian en función de su biogénesis, vías de liberación, tamaño, contenido y función (Kalra et al., 2016). Los VE pueden contener entre lípidos, ácidos nucleicos y proteínas, específicamente proteínas asociadas con la membrana plasmática, el citosol y aquellas involucradas en el metabolismo de los lípidos (Bebelman et al., 2018).

c) Exosomas

Los exosomas son vesículas extracelulares entre 30 a 150 nm de diámetro de origen endocítico formado por la fusión entre cuerpos multivesiculares y la membrana plasmática (Kalra et al., 2016; Zaborowski et al., 2015), estos tienen una bicapa lipídica con proteínas receptoras en su superficie y con contenido citosólico (Figura 7). Los exosomas son liberados por diversos tipos de células como los glóbulos rojos, células dendríticas, plaquetas, linfocitos, células epiteliales y células tumorales, llegando a encontrarse en diferentes tipos de fluidos biológicos (Simons & Raposo, 2009; Simpson et al., 2008; Tian et al., 2013). Los exosomas contienen principalmente proteínas, lípidos, ADN, ARNm y miARNs (Penformis et al., 2016; Ramachandran & Palanisamy, 2012) por lo que son reconocidos como mediadores importantes en la comunicación de célula a célula al transferir su contenido (Dilsiz, 2020).

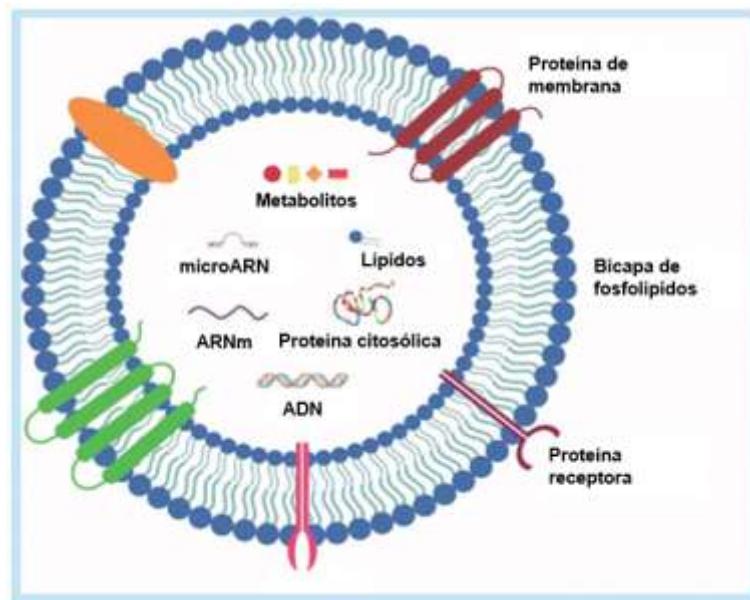


Figura 7: Estructura y contenido de un exosoma

Nota. Adaptado de Dilsiz (2020)

Existen tres mecanismos de interacción entre los exosomas y sus células receptoras. En primer lugar, las proteínas transmembrana de los exosomas interactúan directamente con los receptores de señalización de las células diana (Mathivanan et al., 2010). En segundo lugar, los exosomas se fusionan con la membrana plasmática de las células receptoras y entregan su contenido al citosol (Mulcahy et al., 2014). En tercer lugar, los exosomas se

internalizan en las células receptoras fusionándose con los endosomas pudiendo sufrir transcitosis y ser liberados nuevamente, pero en las células vecinas de la célula receptora, o también podrían madurar hasta convertirse en lisosomas y terminar degradándose (Zhang et al., 2015).

Tanto las células sanas como las cancerosas pueden liberar exosomas al espacio extracelular y los fluidos corporales (Figura 8); sin embargo, las células cancerosas pueden producir aproximadamente diez veces más exosomas en comparación con las células sanas normales (Dilsiz, 2020). Los exosomas derivados de células tumorales tienen funciones múltiples que incluyen el inicio de la progresión tumoral, la supresión inmunitaria, la neovascularización, la metástasis y la resistencia a los medicamentos (Battke et al., 2011; Yang & Robbins, 2011); por lo tanto estos vienen a ser una fuente valiosa para las investigaciones de biomarcadores, ya que su contenido es una gran cantidad de información sobre el estado de su célula de origen y función en los procesos biológicos además de que se liberan en todos los fluidos biológicos, incluida la sangre, las lágrimas, la orina y la saliva (Dilsiz, 2020).

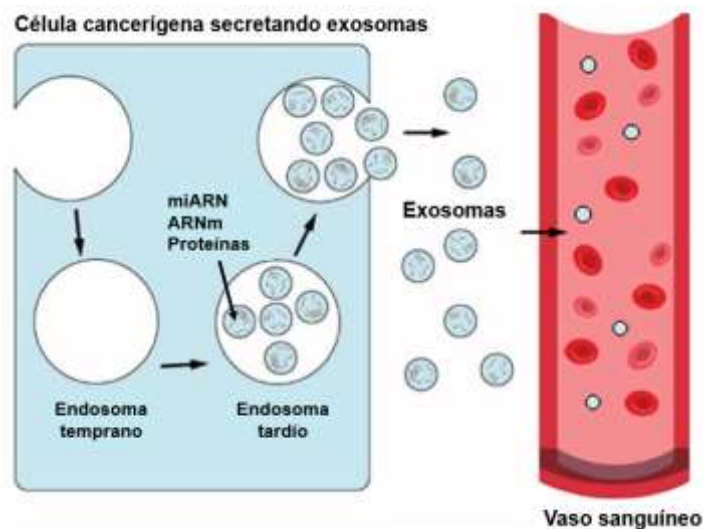


Figura 8: Secreción de exosomas por célula cancerígena

Nota. Adaptado de Dilsiz (2020)

d) microARNs exosomales

Los microARNs exosomales frecuentemente pueden ser liberados por las mismas células tumorales y actuar como mediadores en los procesos de comunicación célula – célula, siendo conducidos hacia otras células cercanas al microambiente tumoral y tener la capacidad de influir en el fenotipo de la célula receptora, reprogramando el transcriptoma celular (Bell & Taylor, 2016), motivo por el cual en los últimos años se ha dado realce al estudio de los microARNs exosomales como biomarcadores más precisos para el pronóstico del cáncer, ya que juegan un rol importante en la progresión, la estimulación de la angiogénesis y la formación facilitada de metástasis en el cáncer (Zhang et al., 2015).

2.3.4. EL ROL DE miR-21 EN EL CÁNCER GÁSTRICO

El miR-21 (miR-21-5p) es uno de los microARNs maduros más expresados y estudiados, además de ser uno de los primeros microARN identificados el cual se encuentra dentro del locus de la proteína de membrana vacuolar 1 (VMP1) en el cromosoma 17 (Jenike & Halushka, 2021); así mismo, este microARN ha sido reconocido como un oncomiR que se sobreexpresa en varios tipos de cánceres humano, incluyendo el cáncer de mama, gástrico, de pulmón, esofágico, colorrectal, del tracto biliar, nasofaríngeo y cánceres de hígado, así como osteosarcoma, glioma, leucemia, retinoblastoma y linfoma (Wu et al., 2015).

En la actualidad, se han identificado un total de 3078 genes humanos como objetivos potenciales de miR-21 y muchos de ellos están involucrados en la regulación de diferentes aspectos del cáncer como la proliferación, la supervivencia, la migración y la invasión celular (Nguyen et al., 2021).

Este miR es capaz de promover la proliferación de células cancerosas inhibiendo directamente la expresión de genes targets que codifican a 4 proteínas supresoras de tumor: PTEN, PDCD4, RECK y SPRY2. Por lo tanto, la sobreexpresión de miR-21 en cáncer genera la disminución de estas proteínas promoviendo así la proliferación celular. Así mismo, al inhibir la expresión de PTEN, miR-21 aumenta indirectamente la expresión de las

proteínas anti-apoptóticas MCL-1 y/o Survivin, promoviendo de esta manera la supervivencia de las células cancerosas (Nguyen et al., 2021).

miR-21 es uno de los miARNs altamente enriquecidos en los exosomas lo que demuestra su alta preferencia al empaquetamiento en este tipo de vehículos moleculares. Existe una amplia evidencia que sugiere la participación de miR-21 exosomal en la regulación de diferentes tipos de cáncer (Shi, 2016).

Varios estudios de meta-análisis han resaltado el rol importante del miR-21 en la patogénesis y progresión del CG; así como el potencial uso de miR-21 circulante como biomarcador no invasivo para la detección temprana, puesto que se ha reportado una expresión significativamente alta tanto en plasma como en suero de pacientes con CG a comparación del grupo control (Yin et al., 2015; Zeng et al., 2013). Del mismo modo, se ha encontrado altas concentraciones del miR-21 en muestras de plasma de pacientes con CG en estadios más avanzados que en otros (Zheng et al., 2011). Por lo tanto, este potencial biomarcador podría ser también un candidato prometedor para el pronóstico del CG, contribuyendo a la estratificación de los pacientes (Komatsu et al., 2013).

2.4. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE microARNs MEDIANTE TÉCNICA DE RT-qPCR

2.4.1. ASPECTOS BÁSICOS DE LA RT-qPCR

a) FUNDAMENTOS DE LA RT-qPCR

La tecnología de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) cuantitativa en tiempo real (qPCR) permite la detección y medición confiables de los productos generados durante todos los ciclos de amplificación de PCR, que son directamente proporcionales a la cantidad de la secuencia plantilla antes del inicio del proceso de PCR (Arya et al., 2005). Para analizar la expresión de las diversas moléculas de ARN (como los microARNs) se requiere la conversión de la plantilla de ARN en ADN complementario (ADNc) como paso previo, a este método se le denomina

transcripción reversa (RT) - PCR cuantitativa (qPCR) (Bhattacharya et al., 2020).

La cuantificación en la PCR en tiempo real se consigue amplificando y monitorizando los ácidos nucleicos diana presente en la muestra. Si el ADNc blanco está presente en la muestra en mayor cantidad, la amplificación y la cuantificación comienzan en la etapa temprana de la reacción; de lo contrario, la amplificación comienza en la última etapa (Chauhan, 2019).

De esta manera, después de la amplificación se realiza la cuantificación absoluta mediante análisis de curva estándar o la cuantificación relativa, empleando las señales de fluorescencia registradas durante la fase exponencial de la reacción (Chauhan, 2019).

b) DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LOS AMPLICONES

Para poder determinar la cuantificación de la expresión génica, no es suficiente con detectar la amplificación en tiempo real y capturar la fluorescencia de cada muestra. Para ello, los termocicladores están proveídos de una PC con un software que generalmente son fáciles de usar. Este software genera una serie de gráficas en donde se muestran todos los datos necesarios para conocer si la reacción fue exitosa (Tamay de Dios et al., 2013). Una muestra la amplificación vs el ciclo umbral (Figura 10) representando el curso y el progreso de la reacción, así como los principales términos asociados con su formación, otra gráfica es la curva de Disociación o de Melting que muestra información sobre la especificidad de la reacción.

La curva de amplificación de la RT-qPCR representa la acumulación de emisión fluorescente en cada ciclo de reacción. La curva se puede dividir en cuatro fases diferentes: la base lineal, la exponencial temprana, la log-lineal y las fases de meseta. Los datos recopilados de estas fases son importantes para calcular la señal de fondo, el valor Ct y la eficiencia de amplificación. La fluorescencia medida como Rn es la intensidad de la emisión fluorescente del colorante de unión al ADN dividida por la

intensidad de la emisión fluorescente del colorante pasivo (Wong & Medrano, 2005).

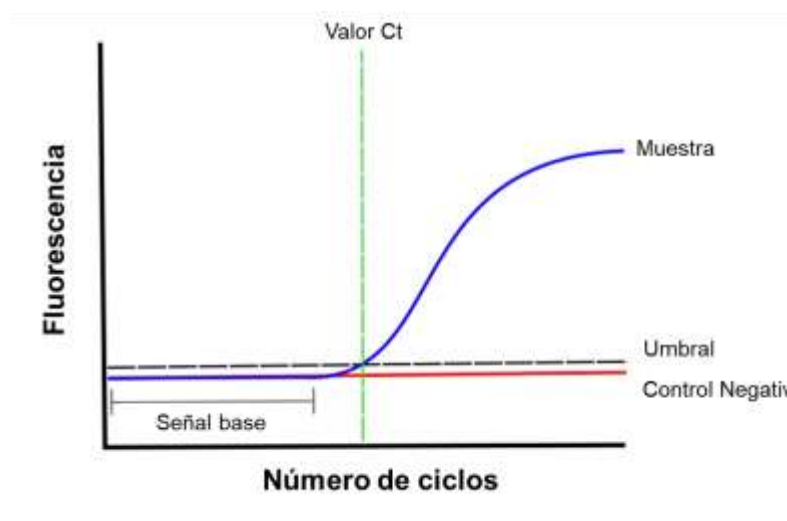


Figura 9: Representación de una curva de amplificación ilustrando las nomenclaturas comúnmente empleadas en la RT-qPCR

Nota. Tomado de Grupo Kepler (2021)

El valor Ct (Ciclo Umbral), es el parámetro más importante en la cuantificación de ADN por qPCR, es el ciclo en el cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente se eleva por encima del ruido de fondo y superando un umbral establecido en referencia a la línea base (Figura 9), indicando la entrada en la fase exponencial de la reacción de la PCR (Arya et al., 2005). Este parámetro es inversamente proporcional a la cantidad inicial del ADNc de interés, ya que cuanto mayor sea la cantidad de ADNc presente en una muestra, menor será el número de ciclos que se requiere para alcanzar el umbral (Ct). De esta forma, a partir del valor Ct se puede cuantificar la cantidad de ADNc, el cual se correlaciona con la cantidad inicial del microARN en el presente estudio.

c) CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LA RT-qPCR

Otro paso importante del análisis es elegir el tipo de cuantificación que se usará para determinar la amplificación precisa del blanco génico; este procedimiento depende de los intereses del investigador. Para ello existen dos tipos de cuantificación: la absoluta y la relativa (Tamay de Dios et al., 2013). Como se puede apreciar en el título del apartado, en el presente estudio se

empleará la denominada cuantificación relativa, ya que esta se aplica cuando se desean evaluar los cambios en la expresión de genes en distintos estados fisiológicos.

Durante la cuantificación relativa, los cambios en la expresión génica de la muestra se miden en función de un estándar externo o una muestra de referencia, también conocida como calibrador (Livak & Schmittgen, 2001). Cuando se utiliza un calibrador, los resultados se expresan como una relación objetivo/referencia. Además, los niveles de expresión del “gen” blanco comparados con un “gen” de referencia (control endógeno) que no cambia su expresión a pesar de que los estados fisiológicos se modifiquen por diversas causas (Tamay de Dios et al., 2013). Existen numerosos modelos matemáticos disponibles para calcular la expresión génica media normalizada a partir de ensayos de cuantificación relativa. Según el método empleado, estos pueden arrojar resultados diferentes y, por lo tanto, medidas discrepantes del error estándar (Liu & Saint, 2002; Muller et al., 2002).

2.4.2. MÉTODOS BASADOS EN LA RT-qPCR PARA EL ANÁLISIS DE microARNs

Tal como se ha descrito la tecnología de la RT-qPCR es considerada el estándar de oro entre las técnicas de detección de microARNs (Hunt et al., 2015; Kotlesek et al., 2018), ya que ofrece un buen equilibrio entre costo, precisión y tamaño de muestra junto con un amplio rango dinámico funcional (Hunt et al., 2015).

Así mismo en comparación con el análisis tradicional basado en qPCR de la expresión de ARNm para genes que codifican proteínas, el estudio de los niveles de expresión de microARN tiene características y desafíos particulares, entre estas características se encuentra la corta longitud de los miARNs y la gran similitud de varios miembros de las familias de miARN (Forero et al., 2019).

De esta manera se han propuesto diversos métodos basados en RT-qPCR para el análisis de la expresión de miARN, en donde el primer paso es convertir el ARN extraído de la muestra en ADNc mediante RT, esto puede realizarse de diversas maneras en donde se aprovecha en incorporar secuencias adicionales

que faciliten la amplificación por PCR y su identificación (Chen et al., 2005; Huang et al., 2015; Lan et al., 2019; Shi & Chiang, 2005). Hay dos enfoques principales que normalmente se usan para hacer esto: (a) usar primers o cebadores de RT específicos de miARNs y (b) extender todos los miARNs con una secuencia común para que la RT se pueda realizar usando un cebador universal (Hunt et al., 2015). Ambos métodos tienen sus beneficios y desventajas, en el primero de los casos, se emplean cebadores tallo-bucle, los cuales son mejores para dirigirse específicamente a la forma madura de los microARNs y, por lo tanto, proporcionan una especificidad mejorada (Hunt et al., 2015), sin embargo, el diseño de estos cebadores es más complejo y además mayormente se emplea una sonda fluorescente como TaqMan que puede ser específico para un miARN (Chen et al., 2005) o puede ser una sonda universal (Jung et al., 2013), el cual se emplea para medir la fluorescencia, dándole mayor complejidad ya que requiere de un profesional experto para el diseño del mismo.

- **MÉTODO BASADO EN LA POLIADENILACIÓN**

Este método se basa en el segundo enfoque antes mencionado, el de extender todos los miARNs con una secuencia común, lo cual en este caso se puede realizar empleando la enzima polimerasa poli(A) (PAP), tal como lo describen Shi & Chiang (2005), la cual poliadenila los miARN maduros y con el empleo de un adaptador poli(T) se puede generar el ADNc de los miARNs, mediante la RT. Posteriormente, para la amplificación por qPCR se emplea un cebador sentido o forward específico del miARN y un cebador antisentido o reverse universal que se une a una región en el adaptador poli(T), donde la fluorescencia es detectada con un fluoróforo intercalante como SYBRGreen (Figura 10).

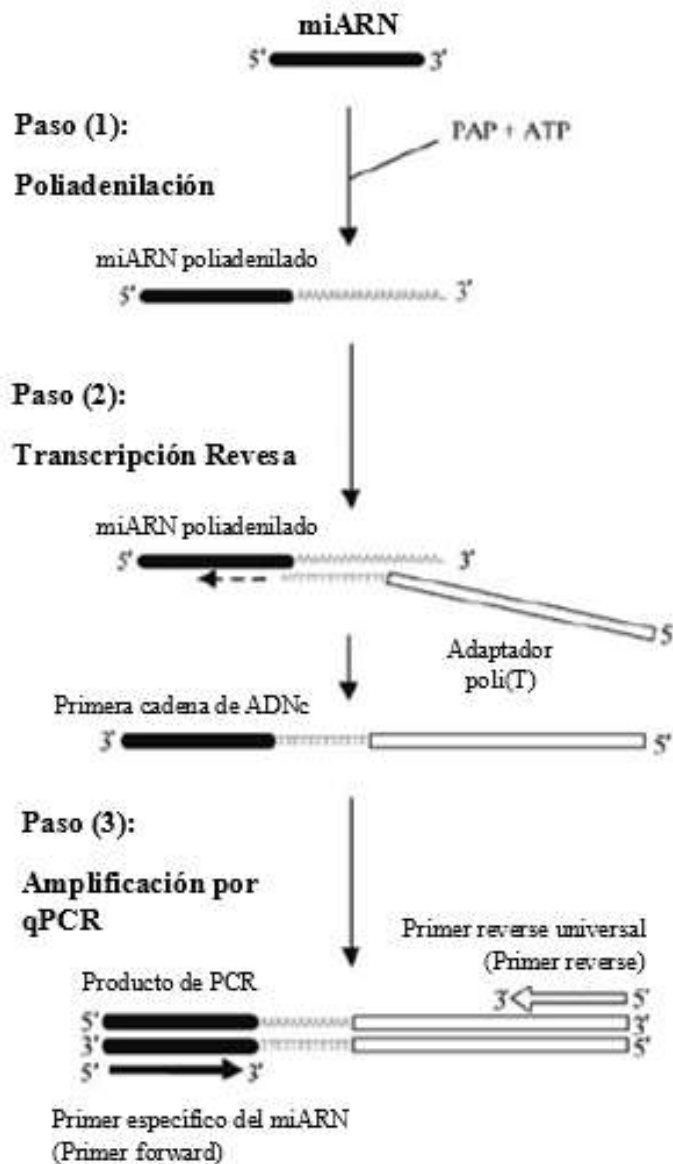


Figura 10: Método de RT-qPCR basado en la poliadenilación

Nota. Adaptado de Shi & Chiang (2005)

Se ha reportado que el método empleando la poli(A) polimerasa es más adecuado para detectar varios miRNAs de una cantidad muy pequeña de muestra inicial, como el plasma (Dangwal et al., 2012). Además esta técnica puede resultar menos compleja y más económica debido al uso del colorante SYBR Green en comparación con el uso de sondas fluorescentes (Forero et al., 2019). Sin embargo, una desventaja de este método es que PAP extiende todos los ARN en la muestra, incluidas las secuencias pri/pre-microARN sin ninguna distinción, aunque esto puede ser mitigado realizando un

fraccionamiento del extracto de ARN total obtenido para eliminar las secuencias más largas como son los pri-microARNs y reducir las secuencias no deseadas en la qPCR (Hunt et al., 2015).

2.5. VARIABLES PRE-ANALÍTICAS

Las variables o parámetros preanalíticos son aquellas relacionadas con la manipulación de las muestras (colección y traslado), los métodos de extracción y las condiciones de almacenamiento antes del procesamiento, los cuales juegan un papel importante en la confiabilidad (precisión y reproducibilidad) de la cuantificación de los miARNs circulantes (Markou & Lianidou, 2019).

Muchos parámetros pre-analíticos permanecen poco definidos y pueden afectar la cuantificación de los miARNs circulantes, así como la interpretación de datos (Salvianti et al., 2020); del mismo modo el análisis de exosomas también se ve fuertemente influenciado por el tratamiento pre analítico, es por ello que se necesitan protocolos estandarizados y consistentes para la recolección y preparación de las muestras (Sekovanić et al., 2021).

2.5.1. HEMÓLISIS Y SU EFECTO EN EL ANÁLISIS DE MICROARNs

Una de las variables pre-analíticas que representa cierto grado de preocupación es el grado de hemólisis en las muestras sanguíneas puesto que algunos estudios han demostrado que la ruptura de los glóbulos rojos (RBCs) que ocurre con mayor frecuencia durante la extracción de sangre o el procesamiento de muestras puede tener un impacto sustancial en los niveles de ciertos microARNs detectables en plasma y suero (Kirschner et al., 2013; McDonald et al., 2011; Pizzamiglio et al., 2017).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO Y PARTICIPANTES DEL ESTUDIO

3.1.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio estuvo conformada por el grupo de pacientes con cáncer gástrico (PC) diagnosticados a través de una evaluación endoscópica superior y el análisis histológico de las biopsias. Las muestras de sangre de los pacientes fueron recolectadas entre los meses de julio y octubre del 2022 en el consultorio de Abdomen del Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas del Norte (IREN-Norte) de la ciudad de Trujillo (La Libertad). Por otro lado, se consideró para este estudio un grupo control de individuos sanos (IS) necesario para determinar el nivel de expresión relativa del microARN circulante miR-21 exosomal plasmático en pacientes con cáncer gástrico. Las muestras de sangre de los individuos sanos fueron recolectadas entre los meses de julio y setiembre del 2022 en el laboratorio de Ingeniería Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa de la ciudad de Nuevo Chimbote (Ancash).

3.1.2. TIPO DE MUESTREO

Se realizó un muestreo por cuotas, un tipo de muestreo no probabilístico, por el cual se fijó un número de muestras teniendo en cuenta principalmente el número limitado de reacciones que se disponía de los kits empleados, además que el número de pacientes diagnosticados con CG en el IREN – Norte fue pequeño a pesar de ser un instituto especializado en el norte del país para recibir casos de neoplasia, ya que en promedio 12 personas al mes son diagnosticados con CG (IREN - Norte, 2022); así mismo, la selección de las muestras se realizó teniendo en cuenta los criterios de elegibilidad tanto para el grupo de pacientes con cáncer gástrico (PC) como para el grupo control de individuos sanos (IS).

3.1.3. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Para la evaluación preliminar del nivel de expresión relativa del microARN circulante mir-21 exosomal plasmático en PC, se fijó un tamaño de la muestra de 5 pacientes con cáncer gástrico y 6 individuos sanos como grupo control, teniendo en cuenta principalmente el número limitado de reacciones que disponíamos de los kits empleados, los cuales fueron utilizados tanto para la etapa previa de estandarización de las metodologías empleadas como para la evaluación preliminar.

3.1.4. CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD DE LOS PARTICIPANTES DEL ESTUDIO

a) Grupo de pacientes con cáncer gástrico (PC)

Criterios de inclusión

- Diagnóstico previo de CG por evaluación endoscópica superior y análisis histológico de las biopsias (Qiu et al., 2016; Valladares-Ayerbes et al., 2012)
- Pacientes con CG que no padezcan de Diabetes mellitus e hipertensión (Jiang et al., 2017; Li et al., 2018).

Criterios de exclusión

- Pacientes con CG que fueron sometidos a procedimientos terapéuticos tales como cirugía, quimioterapia o radioterapia (Qiu et al., 2016; Valladares-Ayerbes et al., 2012)

b) Grupo control de individuos sanos (IS)

Criterios de inclusión

- Personas voluntarias sin diagnóstico de cáncer gástrico u otro tipo de cáncer (Liu et al., 2011).
- Personas de ambos sexos y de edades entre 30 y 80 años (Sung et al., 2021).

Criterios de exclusión

- Personas que padecen de Diabetes mellitus e hipertensión y son fumadores (Jiang et al., 2017; Li et al., 2018).
- Personas con un perfil de glucosa muy elevado (Jiang et al., 2017)
- Personas con un perfil lipídico muy elevado (Simionescu et al., 2014).

Nota: Para la etapa de estandarización se tuvo en cuenta únicamente los mismos criterios de inclusión.

3.1.5. MUESTRA

Para la etapa de estandarización se colectaron muestras de sangre intravenosa a partir de 10 individuos sanos para estandarizar el método de separación de plasma sanguíneo y evaluación del grado de hemólisis; así como, para estandarizar los métodos de extracción y amplificación de microARNs exosomales a partir de plasma sanguíneo (Figura 11).

Para la evaluación preliminar del nivel de expresión relativa del microARN circulante mir-21 exosomal plasmático en pacientes con CG, se analizaron 5 muestras de plasma del grupo de pacientes con cáncer gástrico (PC) y 6 muestras de plasma del grupo control de individuos sanos (IS) (Figura 12).

Así mismo, se obtuvieron los datos de cada paciente con cáncer gástrico e individuo sano a través de una entrevista, los cuales fueron registrados en una ficha clínica (ANEXO 2). Del mismo modo, se obtuvo acceso a los historiales clínicos de los pacientes para el registro de sus características clinicopatológicas y la estadificación de su CG de acuerdo a la octava edición del Sistema de Clasificación de Tumores Malignos TNM (Brierley et al., 2017) de la *Union for International Cancer Control* (UICC). Además, todas las muestras fueron colectadas teniendo en cuenta el consentimiento informado de los participantes del estudio (ANEXO 3), de acuerdo al proyecto de investigación aprobado por el comité de ética del IREN – Norte.

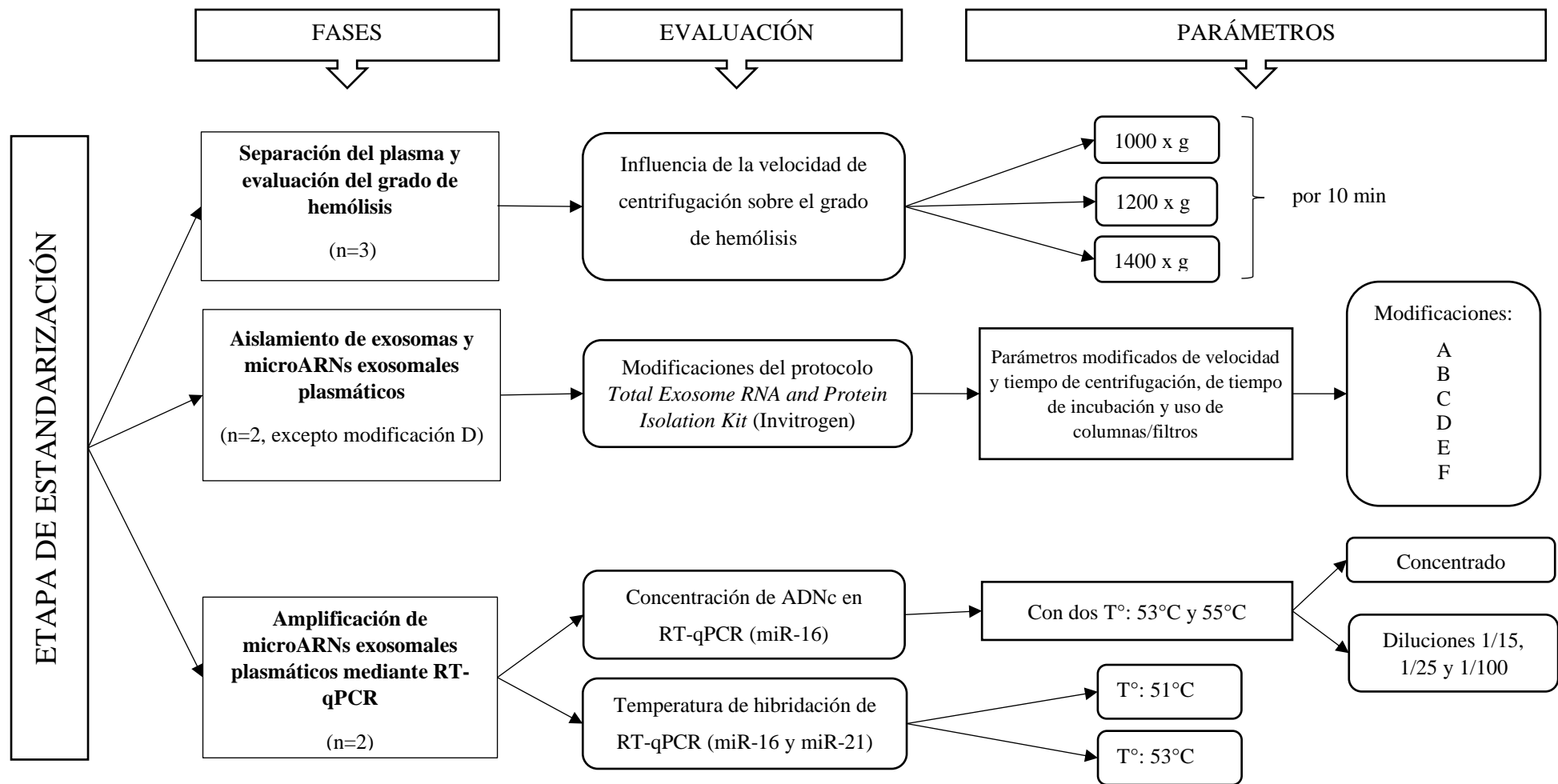


Figura 11: Diagrama de flujo de la etapa de estandarización.

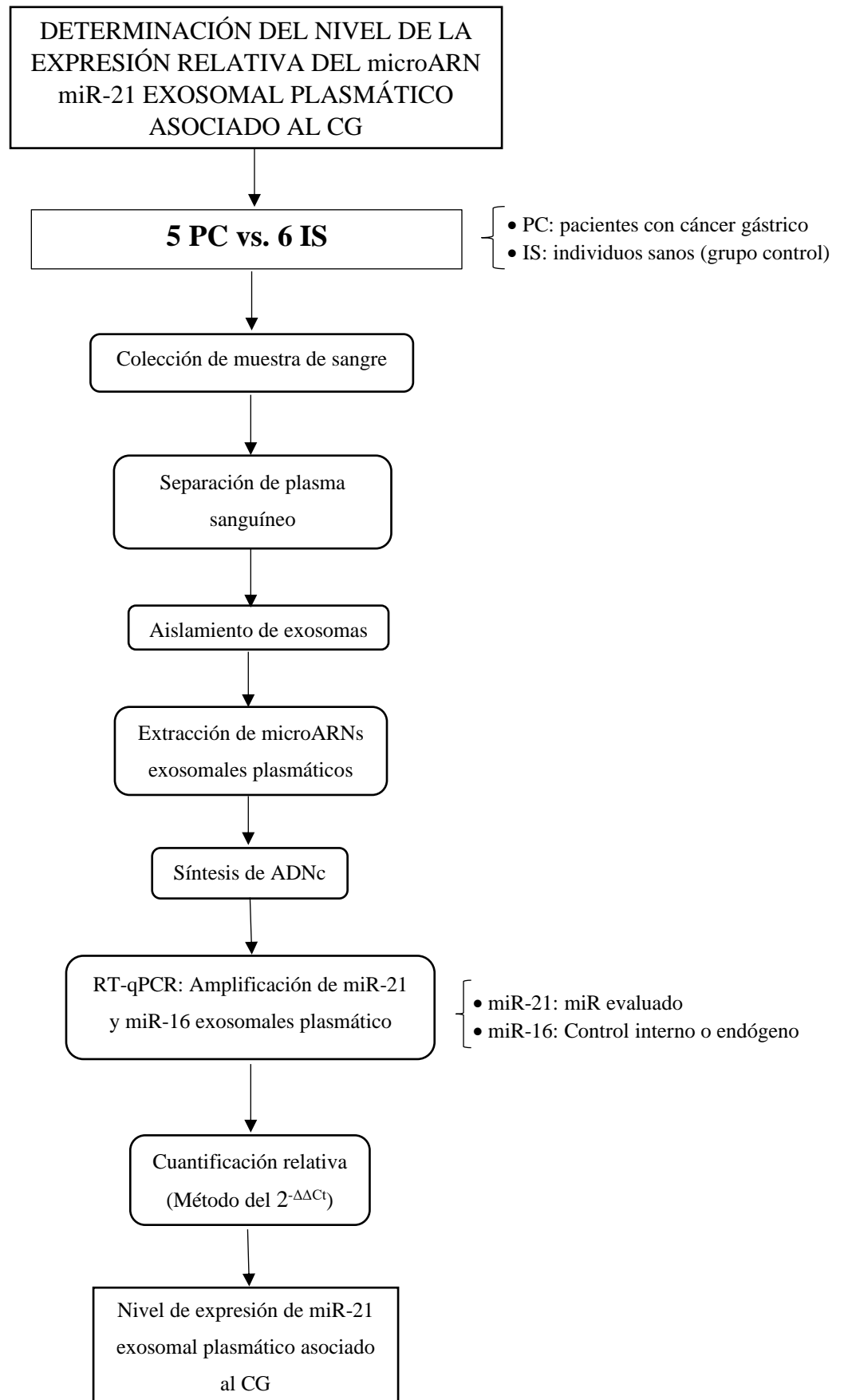


Figura 12: Diagrama de flujo de la determinación del nivel de la expresión relativa del microARN miR-21 exosomal plasmático en PC en comparación con los IS.

3.2.SEPARACIÓN DEL PLASMA SANGUÍNEO Y EVALUACIÓN DEL GRADO DE HEMÓLISIS

En esta primera fase de la etapa de estandarización, inicialmente se colectaron 9 muestras de sangre a partir de individuos sanos en ayunas. Todas las muestras de sangre fueron colectadas en tubos de 6 mL que contenían el anticoagulante EDTA-K2 (10.8 mg) (BD Vacutainer, Ciudad de México, México), anticoagulante adecuado para la separación de plasma con el objetivo de analizar miRNAs por RT-qPCR (Kappel & Keller, 2017). Cada muestra fue homogenizada invirtiendo 10 veces el tubo según las recomendaciones del fabricante (Becton Dickinson and Company, 2013), para que la sangre se mezclara completamente con el anticoagulante y así evitar la formación de coágulos y poder obtener posteriormente el plasma sanguíneo. Inmediatamente después, las muestras de sangre fueron conservadas a 4 °C por un período de 2 horas hasta su posterior procesamiento. Es preciso indicar que el tiempo recomendado para procesar las muestras de sangre mezclada con EDTA-K2 y conservadas a 4°C, es dentro de las 24 horas después de su colección (Suzuki et al., 2022) para evitar el aumento de riesgo de hemólisis y por ende la contaminación de la muestra de plasma con exosomas procedentes de los glóbulos rojos hemolizados (Aguilera-Rojas et al., 2022; Gu et al., 2022).

En esta fase de separación del plasma sanguíneo, se estableció una velocidad de centrifugación que permitió obtener una muestra de plasma con bajo nivel de hemólisis. A partir de las 9 muestras de sangre colectadas, se formaron 3 grupos para evaluar 3 velocidades de centrifugación, cada grupo estuvo formado por muestras diferentes procedentes de dos varones y una mujer. Las 3 velocidades de centrifugación evaluadas fueron: a) 1000 x g (Page et al., 2013), b) 1200 x g (velocidad propuesta) y c) 1440 x g (Qiagen Sample & Assay Technologies, 2012) por un tiempo de centrifugación de 10 minutos y a una temperatura de 4°C. Para esta fase, se usó una centrífuga refrigerada de rotor oscilante modelo Digicen 21 R (OrtoAlresa-Daganzo de Arriba, Madrid, España). Posteriormente, los sobrenadantes de plasma obtenidos luego de cada centrifugación fueron separados cuidadosamente en microtubos de 1.5 mL y conservados a 4°C hasta su posterior procesamiento.

Para realizar la evaluación del grado de hemólisis del plasma sanguíneo obtenido tras la centrifugación, se determinó cualitativamente a través de la inspección visual el grado de color entre amarillo y rojo del plasma, asignando una puntuación del 0

al 3 (ANEXO 4); así mismo, se determinó cuantitativamente la concentración en mg/dL de oxi-hemoglobina en el plasma, midiendo la absorbancia de la oxi-hemoglobina a 414 nm (A414) utilizando un espectrofotómetro NanoDrop™ One (Thermo Fisher Scientific - Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

Finalmente, para la evaluación preliminar del nivel de expresión relativa del microARN miR-21 exosomal plasmático en pacientes con CG, se colectaron muestras de sangre de 5 pacientes con cáncer gástrico y de 6 individuos sanos de manera voluntaria, en tubos vacutainer de 6ml que contenían el anticoagulante EDTA-K2, los cuáles fueron homogenizados invirtiendo los tubos 10 veces. En el caso de las muestras de sangre colectadas de individuos sanos fueron conservadas inmediatamente a 4°C por aproximadamente 2 horas hasta su posterior procesamiento; mientras que, para las muestras de pacientes con cáncer gástrico, el tiempo de conservación a 4°C se extendió hasta 5 o 6 horas debido al largo tiempo de traslado de las muestras ya que estas fueron colectadas en el IREN -Norte de la ciudad de Trujillo y procesadas en los laboratorios de la Universidad Nacional del Santa, en Nuevo Chimbote. Posteriormente las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1440 x g por 10 min a 4°C, el plasma sanguíneo obtenido de cada muestra fue alicuotado en microtubos de 1.5 mL libres de nucleasas y conservados a -80°C para mantener la estabilidad de los exosomas en el plasma hasta su posterior procesamiento (Ge et al., 2014).

3.3. AISLAMIENTO DE EXOSOMAS Y EXTRACCIÓN DE microARNs EXOSOMALES A PARTIR DE PLASMA SANGUÍNEO

El aislamiento de exosomas fue realizado usando el kit comercial *Total Exosome Isolation (from plasma)* de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific - Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) siguiendo el protocolo del fabricante (ANEXO 5), el cual básicamente consistió de tres etapas: la clarificación del plasma mediante centrifugación, el aislamiento de exosomas utilizando proteinasa K y un reactivo precipitador de exosomas, y finalmente la resuspensión de los pellets que contenían los exosomas. Los pellets que contenían los exosomas fueron resuspendidos en PBS 1X frío de acuerdo al tamaño de pellet obtenido teniendo en cuenta las siguientes proporciones: los pellets pequeños fueron resuspendidos en 200 µL, pellets medianos en 250 µL y pellets grandes entre 300 µL a 350 µL.

Por otro lado, se realizó la estandarización del protocolo para la extracción de ARNs pequeños exosomales totales usando el *Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit* de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific - Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), a partir de 200 μ L de exosomas resuspendidos en PBS 1X, para optimizar el procedimiento y obtener una mayor concentración de microARNs. Es importante aclarar que este kit extrae ARNs pequeños exosomales totales menores de 200 nucleótidos y teniendo en cuenta que en promedio el 76% de los ARNs pequeños contenidos en un exosoma es representado por los microARNs exosomales (Huang et al., 2013), es que a partir de este momento nos referiremos a este proceso de extracción con el término de extracción de microARNs exosomales.

Para efectos de la estandarización del protocolo de extracción de microARNs exosomales se utilizaron 11 muestras de plasma sanguíneo de individuos sanos cuya separación de fue realizada siguiendo los parámetros de separación del plasma anteriormente descritos. La estandarización fue realizada a nivel de las 4 etapas que comprende el protocolo de extracción *Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit* las cuales son: a) separación de la fase acuosa, b) unión de ARNs grandes y pequeños, c) lavado de ARNs pequeños y d) elución de ARNs pequeños. Los parámetros originales del protocolo de extracción del kit empleado son presentados en la Tabla 2; mientras que, los parámetros que se modificaron y evaluaron son descritos en la Tabla 3. Por otro lado, se determinó la concentración y pureza de los ARNs pequeños exosomales totales extraídos, por espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop One. La concentración se obtuvo midiendo el valor de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (A260); mientras que, la pureza fue determinada a través de la relación de absorbancias A260/280.

Finalmente, para la evaluación preliminar del nivel de expresión relativa del microARN circulante miR-21 exosomal plasmático en pacientes con CG se realizó el aislamiento de exosomas usando el *Total Exosome Isolation (from plasma) kit* y la extracción de microARNs exosomales usando el protocolo modificado del *Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit* presentado en el ANEXO 6. Para esta evaluación preliminar, se emplearon 5 muestras de plasma del grupo de pacientes con cáncer gástrico (PC) y 6 muestras de plasma del grupo control de individuos sanos (IS). Posteriormente, se midió la concentración y pureza de los ARNs pequeños exosomales totales extraídos utilizando el equipo NanoDrop One.

Tabla 2: Parámetros según protocolo del Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit

Parámetros del	Etapas de la extracción de ARNs				
	Separación de la fase acuosa	Unión de ARNs		Lavado de ARNs pequeños	Elución de ARNs pequeños
		Grandes	Pequeños		
protocolo original	-Centrifugación ≥ 10000 x g por 5 min	-Centrifugación a 10000 x g por 30s -Filtro Invitrogen	-Centrifugación a 10000 x g por 30s -Filtro Invitrogen	-3 centrifugaciones a 10000 x g por 15s - Centrifugación final a 10000 x g por 1 min	-Doble elución de 50 ul c/u, sin incubación - Centrifugación a 20000 x g por 30s

Tabla 3: Parámetros modificados del protocolo Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit

Grupo de comparación	Modificación	Muestra	Etapas de extracción de ARNs				
			Separación de la fase acuosa	Unión de ARNs		Lavado de ARNs pequeños	Elución de ARNs pequeños
				Grandes	Pequeños		
Primero	A	A1	-Centrifugación a 12000 x g (5min), luego a 16000 x g (1min) y después a 19000 x g (1min)	-Centrifugación a 10000 x g por 30s	-Centrifugación a 10000 x g por 30s	-3 centrifugaciones a 10000 x g por 30s	-Doble elución de 50 ul c/u, sin incubación
		A2		-Filtro Invitrogen	-Filtro Invitrogen	- Centrifugación final a 10000 x g por 1 min	- Centrifugación a 20000 x g por 30s
	B	B1	-Centrifugación a 12000 x g (5min), luego a 16000 x g (1min) y después a 19000 x g (1min)	-Centrifugación a 10000 x g por 1min	-Centrifugación a 10000 x g por 1min	-3 centrifugaciones a 10000 x g por 30s	-Doble elución de 50 ul c/u, sin incubación
		B2		-Filtro Invitrogen	-Filtro Qiagen	- Centrifugación final a 10000 x g por 1 min	- Centrifugación a 20000 x g por 30s
	C	C1		-Centrifugación a 12000 x g por 30s	-Centrifugación a 12000 x g por 30s	-3 centrifugaciones a 12000 x g por 15s	-Doble elución de 50 ul c/u, con incubación x 10 min (1°elución) y 5min (2°elución).
		C2	-Centrifugación a 16000 x g por 10 min		-Filtro Invitrogen	-Filtro Invitrogen	- Centrifugación final a 12000 x g por 1 min

Tercero	D	D1	-Centrifugación a 16000 x g por 10 min	-Centrifugación a 12000 x g por 1min	-Centrifugación a 12000 x g por 1min	-3 centrifugaciones a 12000 x g por 1min	-Doble elución: 1° elución de 30 ul con incubación x 10 min y 2°elución de 20 ul con incubación x 5min
				-Filtro Invitrogen	-Filtro Invitrogen	- Centrifugación final a 16000 x g por 3 min	- Centrifugación a 20000 x g por 1min
	E	E1	-Centrifugación a 16000 x g por 10 min	-Centrifugación a 12000 x g por 1min	-Centrifugación a 12000 x g por 1min	-3 centrifugaciones a 12000 x g por 1min	-Doble elución: 1° elución de 30 ul con incubación x 10 min y 2°elución de 20 ul con incubación x 5min
		E2		-Filtro Invitrogen	-Filtro Qiagen	- Centrifugación final a 16000 x g por 3 min	- Centrifugación a 20000 x g por 1min
	F	F1	-Centrifugación a 16000 x g por 10 min	-Centrifugación a 12000 x g por 1min	-Centrifugación a 12000 x g por 1min	-3 centrifugaciones a 12000 x g por 1min	-Doble elución: 1° elución de 30 ul con incubación x 10 min y 2°elución de 20 ul con incubación x 5min
		F2		-Filtro Qiagen	-Filtro Invitrogen	- Centrifugación final a 16000 x g por 3 min	- Centrifugación a 20000 x g por 1min

3.4.AMPLIFICACIÓN DE MICROARNS MEDIANTE RT-qPCR Y DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN RELATIVA DE miR-21 EXOSOMAL PLASMÁTICO ASOCIADO AL CG

La amplificación por RT-qPCR de los microARNs exosomales plasmáticos inició con la obtención del ADNc a partir del ARN exosomal plasmático mediante la poliadenilación y el proceso de transcripción reversa empleando el *miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis kit* (Agilent Technologies, California, Estados Unidos). Para ello se procedió a realizar la primera parte del proceso denominado poliadenilación, en el cual se empleó de 10-12 µl de ARN total obtenido e insumos en la que se destaca la enzima *E. coli* poli A polimerasa (PAP) provista por el kit, el procedimiento se llevó a cabo siguiendo el protocolo del fabricante (ANEXO 7). Posteriormente, se empleó entre 4 a 6 µl de ARN únicamente poliadenilado para la reacción de síntesis de ADNc mediante transcripción reversa de cada muestra agregando los diversos componentes incluyendo el primer adaptador RT (cebador oligo dT ligado a una secuencia adaptadora) y la mezcla de Enzimas AffinityScript RT/RNase Block, provistas por el mismo kit miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis y se siguió de igual manera el protocolo del fabricante, obteniendo un volumen final de 20 µl de la reacción de síntesis de ADNc.

La amplificación de los microARNs se realizó utilizando el kit miRNA qPCR Master Mix (Agilent Technologies, California, Estados Unidos) que contiene como parte de sus componentes el Universal Reverse Primer (cebador anti-sentido) y el 2× miRNA QPCR Master Mix. Para este procedimiento se realizó una pre-mezcla de 12.5 µl de 2× miRNA qPCR Master Mix que contiene el colorante intercalante activo EvaGreen®, 0.375 µl de colorante de referencia pasivo diluido, 1 µl de 3.125 µM universal reverse primer, 1 µl de 3.125 µM miRNA-specific forward primer y el agua de grado PCR libre de Nucleasas para un volumen de total 25 µl por reacción, siguiendo el protocolo del fabricante, una vez alicuotados los 24 µl de pre-mezcla en cada pocillo o tubo de la placa de qPCR se añadió a cada reacción 1 µl del ADNc o de agua libre de nucleasas (control negativo). Las secuencias de los cebadores sentido específicos de los microARNs fueron diseñados a partir de la base de datos miRBase miR-16 (MI0000070) 5' TAGCAGCACGTAAATATTGGCG 3' y miR-21 (MIMAT0000076) 5' TAGCTTATCAGACTGATGTTGA 3', los cuales fueron provistos por IDT (Iowa, Estados Unidos), cuyas propiedades brindadas por los mismos fueron de 45.5% de contenido de GC con 55.6°C de T° Melting, para miR-16 y 36.4% de contenido de GC con 50.9°C de T° Melting, para miR-21. Las

reacciones mezcladas con ADNc se amplificaron en un StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Massachusetts, Estados Unidos), siguiendo los parámetros recomendados por el kit de qPCR empleado y las temperaturas de Melting de los cebadores utilizados (Prediger, 2018) (Tabla 4). Una vez finalizado los ciclos de amplificación y capturadas las señales de fluorescencia emitidas por el colorante se realizó la etapa de curva de Melting o de Disociación para la evaluación de la especificidad de los cebadores y determinar si hay formación específica de los productos de microARNs diana (Chauhan, 2019; Tamay de Dios et al., 2013). La programación para obtención de la curva de Disociación inició con la desnaturalización de los amplicones (productos de PCR) a través de una incubación a 95°C por 1 minuto, luego se incubó a 55°C de 30 a 60 segundos, seguido de una rampa de 0.5°C hasta llegar nuevamente a 95°C, donde se incubó finalmente por 30 segundos, considerando las instrucciones del manual del kit de qPCR empleado.

Tabla 4: Parámetros de amplificación de microARNs mediante RT-qPCR

Ciclos	Etapas de la PCR	Temperatura	Tiempo de Duración
1 ciclo	Activación de la Enzima	95°C	10 min
	Desnaturalización del ADNc	95°C	10 s
40 ciclos	Hibridación de cebadores* ^o	51, 53 o 55°C	15 s
	Elongación de la cadena	72°C	20 s

*Se realizaron pruebas con diferentes temperaturas de hibridación para obtener la temperatura ideal para la amplificación de miR-16 y de miR-21.

^o La recolección de datos del marcador fluorescente en tiempo real inicia en la etapa de hibridación y culmina antes del proceso de elongación (en la rampa).

FUENTE: Basado en los parámetros indicados para la programación de la PCR en el manual del Kit miRNA qPCR Master Mix (Agilent Technologies, California, Estados Unidos).

De esta manera se pudo obtener los valores del ciclo umbral o Ct y T° de Melting de cada producto o amplicón obtenido, los cuales fueron en primer lugar tomados en cuenta para ajustar los parámetros, así como otras variables que influyan para obtener los valores adecuados que representen una mejor expresión de los microARNs exosomales plasmáticos en las muestras.

Con los parámetros ajustados para la amplificación de los microARNs miR-21 y miR-16, este último seleccionado como un control interno o endógeno requerido para normalizar la expresión de miR-21 exosomal plasmático asociado al CG, se

obtuvieron los valores del Ct de los amplicones de las muestras de IS (N=6) y PC (N=5) para determinar el “fold change” o tasa del nivel de expresión promedio del miR-21 exosomal plasmático asociado al CG mediante cuantificación relativa, con el método que emplea la fórmula del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001), tomando como muestras control o calibrador a los IS. Este análisis del nivel de expresión relativa se graficó a una escala logarítmica (base 10) para mejor interpretación de los resultados. Finalmente, se analizó la expresión relativa de miR-21 exosomal plasmático de los pacientes con CG de acuerdo con sus características clinicopatológicas.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se utilizó la prueba de U de Mann–Whitney para determinar el nivel de significancia de la variación de la expresión relativa de miR-21 exosomal plasmático de los pacientes con CG en comparación con los individuos sanos. Además, se empleó U de Mann–Whitney (2 categorías) y Kruskal–Wallis (más de 2 categorías) para analizar la relación entre las características clinicopatológicas y los niveles de expresión relativa miR-21 exosomal plasmático en los pacientes con CG. Todos los análisis se realizaron por duplicado o triplicado, a través del software de procesamiento de datos estadísticos IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM, Estados Unidos) y la gráfica se generó a través del software GraphPad Prism 8.0 (Graphpad Software Inc, California, Estados Unidos). Los niveles de significancia medidos con el valor *P*, se consideraron estadísticamente significante, si el valor *P* era menor a 0.05.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DESCRIPCIÓN Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PARTICIPANTES

Inicialmente se obtuvieron muestras de sangre de 10 individuos sanos las cuales se emplearon para la etapa de estandarización de la separación de plasma sanguíneo y evaluación del grado de hemólisis; así como, la etapa de estandarización de las metodologías para el aislamiento de exosomas y extracción de microARNs exosomales a partir de plasma sanguíneo. Las personas voluntarias que participaron en esta etapa de estandarización cumplieron con los criterios de inclusión considerados en este estudio.

Para la evaluación preliminar del nivel de expresión relativa del microARN circulante miR-21 exosomal plasmático en pacientes con CG, se colectaron muestras de sangre de 5 pacientes los cuales fueron clínicamente diagnosticados con CG. En la Tabla 5 podemos observar las características demográficas y clinicopatológicas de los pacientes con cáncer gástrico e individuos sanos. La mayoría de los participantes fueron mayores de 60 años y tuvieron lesiones carcinogénicas en la región del cuerpo, antro y píloro de sus estómagos, 3 de los pacientes tuvieron adenocarcinomas de tipo difuso y 2 de tipo intestinal; así también tuvieron antecedentes familiares y dos de los 3 pacientes con antecedentes tuvieron familiares con cáncer gástrico. Por otro lado, la mayoría de los PC evaluados fueron clasificados dentro de la etapa IV, la etapa más avanzado del cáncer gástrico lo cual está asociado a un peor pronóstico teniendo un porcentaje de sobrevivencia relativa en 5 años de 5.9% (National Cancer Institute, 2021).

Tabla 5: Características demográficas y clínicas de los participantes

Características demográficas y clínicas de los participantes	CG n=5	IS n=6
Edad		
Promedio (Rango)	70 (55-80)	53 (35-69)
≤60	1 (20%)	4 (83%)
>60	4 (80%)	2 (17%)
Género		
Masculino	2 (40%)	4 (67%)
Femenino	3 (60%)	2 (33%)
Lugar de procedencia		
Ancash	1 (20%)	3 (50%)
La Libertad	2 (40%)	2 (33%)
Cajamarca	2 (40%)	0 (0%)
Pasco	0 (0%)	1 (17%)
Lugar de residencia		
Ancash	0 (0%)	6 (100%)
La Libertad	4 (80%)	0 (0%)
Cajamarca	1 (20%)	0 (0%)
Fumador		
Sí	0 (0%)	0 (0%)
No	5 (100%)	6 (100%)
Diabetes Mellitus		
Sí	0 (0%)	0 (0%)
No	5 (100%)	6 (100%)
Nivel de Glucosa		
Normal	3 (60%)	3 (50%)
Elevado (pre-diabetes)	2 (40%)	3 (50%)
Hipertensión		
Sí	0 (0%)	0 (0%)
No	5 (100%)	6 (100%)
Nivel de Triglicéridos Sérico		
Normal deseado	0 (0%)	3 (50%)
Elevado	0 (0%)	3 (50%)
No reporta	5 (100%)	0 (0%)
Nivel de Colesterol Total		
Normal deseado	0 (0%)	2 (33%)
Elevado	0 (0%)	4 (67%)
No reporta	5 (100%)	0 (0%)
Infección por <i>Helicobacter pylori</i>		
SÍ	1 (20%)	0 (0%)
No	4 (80%)	6 (100%)

Historia Familiar con Cáncer		
Sí	3 (60%)	3 (50%)
No	2 (40%)	3 (50%)
Grado de parentesco por consanguinidad		
1°	3 (100%)	2 (67%)
2°	0 (0%)	0 (0%)
3°	0 (0%)	1 (33%)
Tipo de Cáncer del familiar		
Gástrico	2 (67%)	0 (0%)
Otros	1 (33%)	3 (100%)
Tipo de CG (Clasificación tipo Borrmann)		
I - II	0 (0%)	
III - IV	5 (100%)	
Estadío o Etapa de CG (TNM)		
I	0 (0%)	
II	0 (0%)	
III	1 (20%)	
IV	4 (80%)	
Clasificación Lauren		
Intestinal	2 (40%)	
Difuso	3 (60%)	
Localización del tumor		
Cardias	0 (0%)	
Fondo	0 (0%)	
Cuerpo	2 (40%)	
Cuerpo y Antro	1 (20%)	
Antro y píloro	2 (40%)	

4.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN DEL PLASMA SANGUÍNEO Y EVALUACIÓN DEL GRADO DE HEMÓLISIS

Los parámetros como la velocidad y el tiempo de centrifugación tienen un efecto sobre la separación de componentes y lisis celular durante la preparación de muestras sanguíneas ya sean de plasma o suero, lo que a su vez repercute sobre la cuantificación de los microARNs analizados (Markou & Lianidou, 2019; Schwarzenbach, 2018). En este estudio se evaluó la influencia de la velocidad de centrifugación sobre el grado de hemólisis durante la separación del plasma sanguíneo, con el objetivo de obtener muestras de plasma con el menor grado de hemólisis para así evitar sesgos en la cuantificación de los miARNs exosomales, ya que la ruptura de los glóbulos rojos (RBCs) puede liberar exosomas, los cuales

tendrán otra carga de microARNs exosomales derivados de los glóbulos rojos modificando de esta manera los niveles de expresión de los microARNs exosomales plasmáticos analizados (Aguilera-Rojas et al., 2022; Gu et al., 2022).

Para esto, se evaluaron 3 velocidades de centrifugación: a) 1000 x g, b) 1200 x g y c) 1440 x g por un tiempo de centrifugación de 10 min (Figura 13), encontrando que a 1440 x g se obtuvo el valor de medición más bajo de oxi-hemoglobina ($12.86 \text{ mg/dL} \pm 3.16$) indicando que a esa velocidad de centrifugación el riesgo de hemólisis es bajo. La hemólisis o ruptura de los glóbulos rojos es un fenómeno común que puede ocurrir en cualquier momento de la fase pre-análítica, ya sea durante la colección de la muestra de sangre, transporte, conservación o procesamiento (Kirschner et al., 2013; Smith et al., 2022). Esta no puede ser reducida completamente por centrifugación (Cheng et al., 2013); sin embargo, es muy importante tener en cuenta el grado de hemólisis de la muestra de plasma sanguíneo cuando se pretende analizar microARNs cuya abundancia es dependiente de este factor, tal como lo es miR-16 que a diferencia de miR-21 (independiente del grado de hemólisis) se encuentra de forma abundante en los glóbulos rojos por lo que su alta expresión puede estar asociada a la hemólisis (Kirschner et al., 2011; Pizzamiglio et al., 2017). Por ejemplo, se ha observado en suero que una concentración de hemoglobina de 25 mg/dL estuvo asociado a un aumento en Ct de 1 a 2, es decir, un aumento de 2 a 4 veces en el número de copias del miR-16 (McDonald et al., 2011). Kirschner et al. (2011) determinaron que las mediciones de absorbancia a 414 nm mayores de 0.2 equivalentes a 9 mg/dL (0.016% RBCs) de hemoglobina, correspondían a muestras de plasma hemolizadas que afectaban significativamente el nivel de expresión de miR-16 a comparación de las muestras de plasma no hemolizadas. Por otro lado, Aguilera - Rojas et al. (2022) establecieron tres grados de hemólisis para muestras de suero: No hemolizado correspondiente a 6 mg/dL (0 % RBCs), hemólisis baja entre 7 mg/dL (0.004% RBCs) y 18 mg/dL (0.063% RBCs) y hemólisis alta mayor a 27 mg/dL (0.125% RBCs). Los datos de concentración de oxi-hemoglobina obtenidos para las tres velocidades de centrifugación evaluadas, corresponden a grados de hemólisis baja; además, se observó una relación inversamente proporcional ya que, al aumentar la velocidad de centrifugación para separar el plasma sanguíneo, la concentración de oxi-hemoglobina disminuyó. Finalmente, se eligió realizar el proceso de separación de plasma sanguíneo de las posteriores evaluaciones a 1440 x g por 10 min, ya que se obtiene niveles de hemólisis más cercanos al umbral del grado no hemolizado.

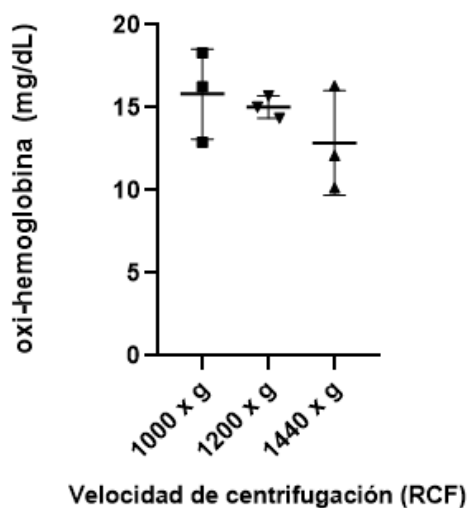


Figura 13: Concentración de oxi-hemoglobina (mg/dL) según la velocidad de centrifugación (RCF) usada para la separación de plasma sanguíneo

No obstante, en la inspección visual (Tabla 6) no se encontró una relación directamente proporcional entre el puntaje de inspección visual y la concentración de oxi-hemoglobina puesto que el plasma separado a 1440 x g, el cual tuvo la concentración más baja (12.86 mg/dL ± 3.16), alcanzó un puntaje de 0.8; mientras que las muestras de plasma separadas a 1000 x g y 1200 x g tuvieron puntajes de 0.6 correspondientes a concentraciones de 15.82 mg/dL ± 2.73 y 15.03 mg/dL ± 0.68 respectivamente. Diferentes estudios sugirieron que la inspección visual no debe ser considerada como parámetro de determinación del nivel de hemólisis a diferencia de la medición por espectrofotometría de oxi-hemoglobina que arroja datos más confiables y permite diferenciar entre grados de hemólisis bajos y altos (Aguilera-Rojas et al., 2022; Shah et al., 2016); sin embargo, la inspección visual puede ser considerada en un primer momento para diferenciar con claridad aquellas muestras de plasma que presentaron un alto grado de hemólisis por su aspecto rosado o rojizo y poder descartarlas de esta manera (Kim et al., 2022); además, según los resultados que hemos obtenido, las muestras de plasma separadas a una velocidad de centrifugación de 1440 x g por 10 min, presentaron apariencias visuales ≤ 1 por lo que esta información es importante para poder descartar muestras con puntajes visuales >1 .

Tabla 6: Puntaje de inspección visual y concentración de oxi-hemoglobina en plasma sanguíneo obtenido bajo diferentes velocidades de centrifugación

Velocidad de centrifugación (RCF)	Código de muestra	Apariencia	Promedio de inspección visual	Medición oxi-hemoglobina	
				Concentración mg/dL	Promedio \pm DE
1000 x g	H4C	amarillo oscuro opaco		18.3	
	H4E	amarillo oscuro	0.6	16.25	15.82 \pm 2.73
	H4D	amarillo oscuro		12.9	
1200 x g	H3C	amarillo oscuro traslúcido		14.35	
	H3E	amarillo oscuro	0.6	15.7	15.03 \pm 0.68
	H3G	amarillo opaco		15.03	
1440 x g	H2A	amarillo anaranjado		10.15	
	H2F	amarillo anaranjado	0.8	16.33	12.86 \pm 3.16
	H2G	amarillo claro		12.1	

*Para cada parámetro de centrifugación se evaluaron 3 muestras de sangre procedentes de: dos varones y una mujer.

4.3. ESTANDARIZACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS PARA EL AISLAMIENTO DE EXOSOMAS Y EXTRACCIÓN DE microARNs EXOSOMALES A PARTIR DE PLASMA SANGUÍNEO.

A pesar de que los microARNs exosomales son reconocidos por su importante papel en la regulación postranscripcional de la expresión génica y el hecho de encontrarlos en los fluidos corporales aperturando un acceso mínimamente invasivo al estudio del estado fisiopatológico de una persona a comparación de métodos de diagnóstico más invasivos como las biopsias de tejido (Dunlop et al., 2021), su validación como biomarcadores para fines clínicos representa todo un desafío debido a las bajas concentraciones de estos tanto en muestras de suero como en plasma sanguíneo (Chevillet et al., 2014; Huang et al., 2013).

Actualmente, existen discrepancias en la metodología de detección debido a la falta de estrategias de normalización definidas y de protocolos pre-analíticos homogéneos (Gevaert et al., 2018; Poel et al., 2018); por lo tanto, es de suma importancia realizar la evaluación y optimización de protocolos para extraer microARNs exosomales con alta calidad, rendimiento y pureza; así como, el análisis de expresión de microARNs exosomales a partir de plasma sanguíneo.

En este contexto, se realizaron modificaciones del protocolo *Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit* para mejorar el rendimiento de extracción de los microARNs exosomales. La estandarización del protocolo fue realizada a nivel de 4 etapas: a) separación de la fase acuosa, b) unión de ARNs grandes y pequeños, c) lavado de ARNs pequeños y d) elución de ARNs pequeños (Tabla 2), y se formaron 3 grupos de comparación para poder analizar los resultados.

En el primer grupo de comparación se evaluaron las modificaciones A y B, los detalles de las modificaciones efectuadas respecto al protocolo original del kit son mostradas en las Tablas 2 y 3. Para este primer grupo de comparación existieron 2 parámetros evaluados en la etapa de unión de ARNs, el primero fue el tiempo de centrifugación en la etapa de unión tanto de ARNs grandes como pequeños, evaluándose la centrifugación de 10000 x g por 30s (modificación A) así como por 1 min (modificación B). El segundo parámetro fue el uso de columnas/filtros para la unión de ARNs pequeños dónde se utilizaron dos tipos de columnas/filtros de purificación, el suministrado por el propio *Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit* (modificación A) y el otro proveniente del *miRNeasy Serum/Plasma Kit* (Qiagen, Hilden, Alemania) llamado *RNeasy MinElute Spin Columns* (modificación B).

Por otro lado, se modificaron dos parámetros respecto al protocolo original, el primero en la etapa de separación de la fase acuosa, donde se definió la velocidad y tiempo de centrifugación ya que en el protocolo original permitía la opción de usar una velocidad de centrifugación mayor o igual a 10000 x g por 5 min es por eso que se evaluó a 12000 x g por 5 min; pero al observar que se obtenía un bajo rendimiento de separación de la fase acuosa es decir poco volumen de separación y una fase intermedia dispersa e inestable, se decidió aumentar la velocidad de centrifugación a 16000 x g por 1min adicional observándose que este rendimiento mejoraba pues la fase intermedia era más compacta y se lograba recuperar mayor volumen de fase acuosa, por ende se hizo un tercer aumento de velocidad a 19000 x g por 1 min adicional observándose que este rendimiento se mantenía, logrando separarse un volumen de 250 μ l de fase acuosa. El segundo parámetro modificado respecto del protocolo original fue el tiempo de centrifugación empleado en la etapa de lavado de ARNs pequeños, extendiéndose de 15 s a 30s por 10000 x g.

Finalmente, de este primer grupo de comparación, se observó un mejor rendimiento en la obtención de ARNs pequeños exosomales totales con la modificación A (4.5 ± 0.94 ng/ μ L) a comparación de la modificación B (2.9 ± 0.38 ng/ μ L), para el cual se

mantuvo el tiempo de centrifugación de la etapa de unión tanto de ARNs grandes como pequeños y se usó la columna/filtro suministrado por el *Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit* para la etapa de unión de ARNs pequeños; así mismo, se obtuvo un mayor nivel de pureza en comparación con la modificación B según los datos mostrados en la Tabla 7.

Algunos estudios en los cuales se utilizaron el mismo kit de extracción de microARNs exosomales mostraron bajos rendimientos de extracción, por ejemplo Zhao et al. (2016) utilizando este mismo kit para analizar microARNs exosomales aislados de 800 ul de suero bovino obtuvieron una concentración de 0.314 ng/ μ L; mientras que, Tang et al. (2017) a partir de exosomas aislados de 500 ul de suero sanguíneo de personas sanas obtuvieron una concentración aproximada de 2.66 ng/ μ L, el cual fue uno de los mejores rendimientos entre las 5 metodologías que compararon; así mismo, Yareta (2018) obtuvo concentraciones menores de 5 ng/ μ L a partir del suero sanguíneo de pacientes con Tuberculosis. Sin embargo, a pesar de que la concentración de ARNs pequeños exosomales totales que se obtuvo con la modificación A, fue mejor que los reportados por Tang et al. (2017) y Zhao et al. (2016), las muestras mostraron presencia de contaminantes en el eluido final ya que la relación de absorbancia A260/280 obtenida fue menor del rango de pureza adecuado (>1.8) para las mediciones de expresión génica (Becker et al., 2010).

En el segundo grupo de comparación, se evaluaron las modificaciones C y D, para los cuales se cambió la velocidad y tiempo de centrifugación de separación de la fase acuosa por 16000 x g por 10 min, ya que en el anterior grupo de comparación se apreció un mejor rendimiento de separación a 16000 x g y se extendió el tiempo de 5 min a 10 min para una mejor definición (aglomeración) de la fase intermedia. Además, se mantuvo el uso de las columnas/filtros suministrados por el *Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit* en la etapa de unión de ARNs pequeños, mientras que se elevó la velocidad de centrifugación de 10000 x g a 12000 x g y se evaluaron los tiempos de centrifugación tanto en las etapas de unión de ARNs grandes y pequeños como en la etapa de lavado.

Adicionalmente, en la etapa de elución se evaluó el volumen de la doble elución de los ARNs pequeños, un volumen final de 100 ul (modificación C) y el otro de 50 ul (modificación D); así mismo, se consideró un tiempo de incubación para cada elución ya que este criterio de incubación no estaba considerado en el protocolo

original. Los resultados obtenidos en este grupo de comparación fueron mejores respecto al primer grupo de comparación según los datos mostrados en la Tabla 7 (modificaciones C y D) ya que con esto se mejoró tanto la concentración de ARNs pequeños exosomales totales como el nivel de pureza, pero se obtuvo una mayor concentración extendiendo el tiempo de centrifugación para la unión tanto de ARNs grandes como pequeños y eluyendo los ARNs pequeños con un menor volumen de doble elución.

Finalmente, en el tercer grupo de comparación se trabajó con los parámetros del segundo grupo de comparación con los que se obtuvieron mejores resultados y se evaluaron las modificaciones E y F. La modificación E consistió en usar la columna/filtro suministrado por el *Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit* para la unión de ARNs grandes, pero para la etapa de unión de ARNs pequeños se cambió por la columna/filtro *RNeasy MinElute Spin Columns* de Qiagen; mientras que, para la modificación F se cambió el orden de las columnas/filtros evaluadas en la modificación E. Se obtuvo una mayor concentración de ARNs pequeños exosomales totales (18.8 ± 0.99 ng/ μ L) con la modificación E, demostrando que la columna/filtro *RNeasy MinElute Spin Columns* de Qiagen es más eficiente que la columna/filtro suministrada por el *Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit*, en la etapa de unión de ARNs pequeños. Sin embargo, el nivel de pureza obtenido fue menor según los datos mostrados en la Tabla 8 (modificaciones E y F). Probablemente, se pudo haber obtenido mejores rendimientos con la columna/filtro de Qiagen si se hubiese utilizado un mayor volumen de etanol absoluto para la unión de ARNs pequeños (Dunlop et al., 2021) ya que este filtro trabaja con proporciones grandes entre 1.5 a 2 volúmenes de etanol absoluto para la fijación de ARNs pequeños (Qiagen Sample & Assay Technologies, 2012); mientras que, en la evaluación se utilizó la proporción de 0.67 (2/3) de volumen según lo empleado por el *Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit* en esta etapa de unión de los ARNs pequeños.

Tabla 7: Cuantificación de ARNs pequeños exosomales totales obtenidos en la etapa de estandarización del protocolo *Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit*

Grupo de comparación	Modificación	Concentración de ARN (ng/μL) ± DE	Abs 260/280 ± DE
Primero	A	4.5 ± 0.94	1.39 ± 0.08
	B	2.9 ± 0.38	1.28 ± 0.21
Segundo	C	5.65 ± 0.92	1.58 ± 0.18
	D	6.53 ± 0.0	1.48 ± 0.0
Tercero	E	18.8 ± 0.99	1.47 ± 0.07
	F	6.20 ± 1.93	1.84 ± 0.25

Las modificaciones efectuadas al protocolo del *Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit* mejoraron el rendimiento de extracción de los ARNs pequeños exosomales totales; no obstante, parece que el cambio de la columna/filtro en la etapa de unión de ARNs pequeños por el *RNeasy MinElute Spin Columns* de Qiagen fue crucial para obtener un mejor rendimiento de extracción.

Se ha demostrado que los métodos de extracción de ARN que combinan tanto las columnas/filtros como el fenol para la purificación del mismo, son los que obtienen altos niveles de recuperación de ARN total, especialmente empleando las columnas comerciales para muestras de biofluidos, los cuales han demostrado ser altamente eficientes para la recuperación de microARNs (Oh et al., 2015). Las columnas/filtros evaluadas en el tercer grupo de comparación para la estandarización del protocolo de extracción de microARNs exosomales, son matrices de purificación de ARN basadas en la tecnología de sílice que en combinación con el uso de agentes caotrópicos como las sales de guanidino a diferentes concentraciones y pH, son capaces de adsorber el ARN en la superficie de las partículas de sílice permitiendo la separación del mismo (Hu et al., 2020); no obstante, se obtuvieron rendimientos diferentes lo cual podría ser debido al tipo de material de sílice del cual está compuesto la columna/filtro ya que la *RNeasy MinElute Spin Columns* de Qiagen tiene una membrana de sílica-gel; mientras que la columna/filtro del *Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit*, una membrana de fibra de vidrio.

4.4. EXTRACCIÓN DE microARNs EXOSOMALES PARA EL ANÁLISIS DE miR-21 EXOSOMAL A PARTIR DE PLASMA SANGUÍNEO

Para evaluar el nivel de expresión relativa de miR-21 exosomal plasmático asociado al CG, se realizó la extracción de los microARNs exosomales a partir de plasma de 5 PC y 6 IS teniendo en cuenta los parámetros estandarizados para la separación de plasma sanguíneo y la evaluación del grado de hemólisis.

Los datos de concentración de microARNs exosomales plasmáticos obtenidos de las muestras de PC e IS son presentados en la Tabla 8. La concentración mínima y máxima de ARNs pequeños exosomales totales que se obtuvo en el grupo de IS fueron de 14.6 ± 0.70 ng/ μ L y 51.7 ± 0.45 ng/ μ L respectivamente; mientras que, para el caso del grupo de PC fueron de 20.5 ± 0.36 ng/ μ L y 39.5 ± 0.46 ng/ μ L respectivamente. Los rangos de concentraciones obtenidas fueron mucho mejores que lo hallado durante la estandarización del protocolo de extracción de microARNs exosomales, así mismo, fueron más favorables para la síntesis de ADNc ya que según las recomendaciones del kit utilizado para este procedimiento (*miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis kit*) se necesitaban cantidades de ARN entre 30 ng y 1 μ g lo cual significaba concentraciones mayores de 2.5 ng/ μ L. No obstante, los niveles de pureza encontrados no fueron tan altos y se mantuvieron en un promedio de 1.5 en la relación de absorbancia de 260/280, lo cual podría afectar el análisis de expresión de los microARNs, ya que una relación superior a 1,8 es más adecuada para las mediciones de expresión génica (Becker et al., 2010).

Tabla 8: Cuantificación de ARNs pequeños exosomales totales de muestras del grupo control y de pacientes con cáncer gástrico

IS	ARN (ng/ μ L) \pm DE	Abs 260/280 \pm DE	PC	ARN (ng/ μ L) \pm DE	Abs 260/280 \pm DE
IS1	16.4 \pm 0.42	1.6 \pm 0.06	PC2	21.2 \pm 0.60	1.5 \pm 0.04
IS2	19.0 \pm 0.40	1.5 \pm 0.03	PC7	21.9 \pm 0.32	1.4 \pm 0.03
IS3	51.7 \pm 0.45	1.5 \pm 0.01	PC8	20.5 \pm 0.36	1.5 \pm 0.05
IS4	14.6 \pm 0.70	1.5 \pm 0.07	PC9	23.1 \pm 0.68	1.4 \pm 0.04
IS5	20.2 \pm 0.92	1.5 \pm 0.04	PC10	39.5 \pm 0.46	1.5 \pm 0.01
IS6	16.9 \pm 0.17	1.5 \pm 0.07	----	----	----

Es importante mencionar que para este estudio las muestras de sangre fueron conservadas a 4°C inmediatamente después de su colección; sin embargo, los tiempos de procesamiento se diferenciaron entre las muestras de IS y PC, ya que las muestras de IS fueron colectadas y procesadas en la ciudad de Nuevo Chimbote, por lo que fueron procesadas luego de las 2 primeras horas de la colección; mientras que, las muestras de PC fueron procesadas después de 5 o 6 horas debido a que estas muestras fueron colectadas en la ciudad de Trujillo. En este estudio no se evaluó el efecto de esta diferencia en el tiempo de procesamiento sobre el nivel de expresión de los microARNs exosomales; sin embargo, se tiene el reporte de Suzuki et al. (2022) quienes encontraron que el nivel de expresión no se ve afectado si las muestras de sangre mezclada con el anticoagulante EDTA-K2 son conservadas a temperatura de 4°C y son procesados dentro de las 24 horas después de la colección.

4.5. AJUSTE DE PARÁMETROS PARA AMPLIFICACIÓN DE microARNs MEDIANTE RT-qPCR

De acuerdo con el manual del fabricante del kit miRNA qPCR Master Mix (Agilent Technologies, N° 600583), el colorante de referencia pasivo se proporciona como un reactivo opcional que se puede agregar para compensar las variaciones de fluorescencia no relacionadas con la PCR, sin embargo, en este estudio hemos encontrado que este reactivo es totalmente necesario en cada prueba, al emplear el instrumento StepOnePlus™ Real-Time PCR System.

Para evaluar la concentración del colorante de referencia pasivo diluido para la amplificación de miR-16 y miR-21, se compararon las concentraciones finales de 30 nM y 300 nM, siendo esta última con la que se pudo detectar fluorescencia y los resultados de los controles negativos fueron los esperados ya que el valor del Ct de ambos amplicones de miR-21 y miR-16 fueron indeterminados (Figura 14). La lectura de la fluorescencia del colorante de referencia pasivo para la normalización de las señales de fluorescencia emitidas por el colorante activo EvaGreen®, depende entonces de la concentración final del colorante de referencia pasivo, según el manual del kit para los instrumentos que no permiten una longitud de onda de excitación cercana a 584 nm el colorante de referencia pasivo debe emplearse a una concentración final de 300 nM. En este caso el StepOnePlus™ Real-Time PCR System, según las especificaciones técnicas tiene un sistema óptico cuya fuente de excitación es un LED azul y el detector es un fotodiodo. Mulberry et al. (2017) reportaron en su diseño óptico de medición de fluorescencia en tiempo real para qPCR que un LED azul instalado en el sistema emite una luz de excitación cuya longitud de onda es de 470 nm, el cual es filtrado a través de un filtro de excitación de paso de banda, que filtra longitudes de onda de 455 a 495 nm; siendo entonces un instrumento con una longitud de onda de excitación lejana a 584 nm. Posteriormente la luz de excitación viaja y es absorbida por la muestra en el pocillo o tubo de la placa de qPCR, para finalmente emitir una luz que es detectada por un fotodiodo. De esta manera se puede considerar que el instrumento empleado en el presente estudio tiene un sistema similar al descrito por Mulberry dado que emplean la misma fuente de excitación, siendo entonces necesario para optimizar el proceso, el empleo del colorante de referencia pasivo a una concentración final de 300 nM, tal como lo describe el kit de qPCR.

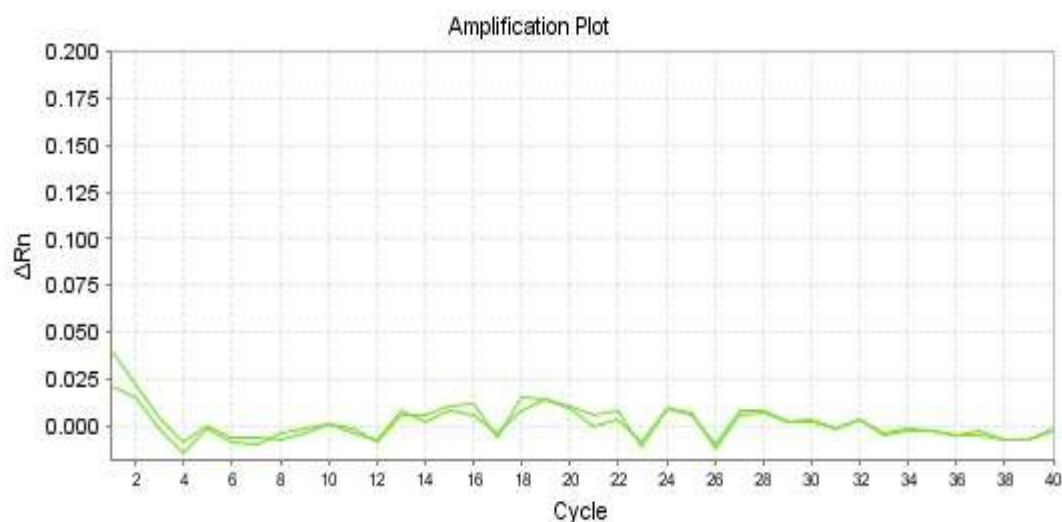


Figura 14: Amplificación de Controles Negativos de miR-21 y miR-16 mediante RT-qPCR, empleando 0.375 μ L de colorante de referencia diluido a 300 nM por reacción.

Así también se determinó que no es necesario diluir el ADNc obtenido luego de realizado el proceso de transcripción reversa para emplearlo como muestra diana para las amplificaciones de miR-21 y miR-16 exosomal plasmático, ya que tal como se muestra en la Tabla 9, con la muestra concentrada a dos diferentes parámetros de T° de hibridación se obtuvieron valores de Ct más bajos lo cual se relaciona con una mayor cantidad inicial de miR-16 en la muestra. Esto posiblemente se debió a la concentración del ADNc empleado, el cual se obtuvo a partir de una concentración baja de ARNs pequeños exosomales plasmáticos (6.53 ng/ μ L), como se aprecia en la Tabla 7. Sin embargo, se decidió seguir empleando el ADNc sin diluir en todos los próximos ensayos, a pesar de que las concentraciones de ARNs pequeños exosomales plasmáticos de las muestras finales obtenidas en comparación con la muestra D1 (véase Tabla 8) aumentaron, ya que se esperaba que el valor de Ct se reduzca aún más teniendo en cuenta la abundancia del microARN miR-16 en el plasma sanguíneo (Kroh et al., 2010).

Es preciso mencionar que se seleccionó a miR-16 para ajustar diversas variables o parámetros necesarios en la amplificación de microARNs, debido a que es un microARN que se expresa de forma abundante y estable en el suero y plasma sanguíneo (Benson & Skaar, 2013; Song et al., 2012). Así también se determinó que miR-16 exosomal a partir de suero se encuentra con una abundancia relativa y una expresión consistente entre muestras de pacientes con cáncer gástrico con y sin metástasis (Liu & Chu, 2020), por lo que en esta investigación también se empleó como control interno o endógeno para la normalización de la expresión de miR-21 exosomal plasmático asociado al CG, tal como lo veremos en el próximo apartado.

Tabla 9: Valores de Ct y T° de Melting de los productos o amplicones de RT-qPCR a partir de una muestra de ADNc concentrada o diluida.

miARN	T° de Hibridación	MUESTRAS*	Ct	T° Melting (1)	T° Melting (2)
miR-16	55°C	D1 (Concentrado)	31.628	80.105	62.980
		D1 (1/15)	35.286	80.850	62.983
		D1 (1/100)	37.062	80.602	62.983
		C (-)⁺	Indeterminado	62.735	-
	53°C	D1 (Concentrado)	33.087	79.857	-
		D1 (1/15)	36.196	80.353	-
		D1 (1/25)	36.276	79.857	-
		C (-)⁺	Indeterminado	62.982	-

*La muestra D1 empleada hace referencia a la muestra descrita en la Tabla 3.

⁺ Control negativo de la amplificación, con todos los reactivos del mix pero sin muestra de ADNc.

Por otro lado, en la qPCR al igual que en una PCR convencional es importante definir la temperatura de hibridación óptima para que se una adecuada complementariedad entre la secuencia diana y los cebadores. Si los cebadores diseñados son los correctos y la temperatura de hidridación es la apropiada, la estabilidad y especificidad de la estructura será eficiente (Chauhan, 2019; Tamay de Dios et al., 2013). La temperatura de hibridación elegida para la qPCR depende directamente de la longitud y composición de los cebadores, así como de la T°de Melting de los mismos. La definición de las temperaturas de hibridación óptimas darán como resultado el mayor rendimiento del producto de PCR esperado (Prediger, 2018). Sin embargo, si no se consideran las condiciones óptimas para definir la temperatura de hibridación, puede surgir la formación de dímeros de cebadores o productos inespecíficos lo cual afectaría el rendimiento de la reacción, así como la especificidad del producto esperado (Chauhan, 2019; Tamay de Dios et al., 2013).

De esta manera, se tuvo en cuenta en primer lugar que las T°M de los cebadores sentido específicos de los microARNs exosomales plasmáticos miR-21 y miR-16 no son las ideales para ser óptimos cebadores ya que son menores por aproximadamente 6 a 11°C de la T°M ideal (62°C), sin embargo al ser cebadores específicos de las secuencias completas de los microARNs mencionados, estos no pudieron ser

modificados ni alargados, por lo que se solucionó buscando una temperatura de hibridación que no esté más de 5°C por debajo o por encima de la T° de Melting de estos cebadores (Prediger, 2018). Además, al desconocer la secuencia y la T° de Melting del cebador antisentido universal, dificultó el proceso, sin embargo, se consideró la duración del tiempo de cada etapa del ciclo que se mencionaba en el protocolo del fabricante del kit. Por último, se definió la temperatura de hibridación necesaria para amplificar los microARNs exosomales plasmáticos miR-21 y miR-16, que fue de 51°C, tal como se puede apreciar en la Tabla 10, donde se observa los valores del Ct y T° Melting de una muestra, tanto en la amplificación con una T° de Hibridación de 51°C y 53°C. Es preciso mencionar que previamente se decidió no comparar con una T° de 55°C porque como se puede revisar en la Tabla 9, con esa T° de hibridación la curva de Melting del amplicón de miR-16 detecta una 2da T° de Melting, lo cual podría deberse a la formación de dímeros de cebadores (Ahmed et al., 2017).

Tabla 10: Valores de CT y T° de Melting de los productos o amplicones de RT-qPCR, empleando diferentes parámetros de amplificación en la etapa de hibridación

T° de Hibridación	miARN	MUESTRA	CT	T° Melting (1)	T° Melting (2)
51°C	miR-16	E1*	31.256	78.864	-
			31.690	79.098	-
		C(-) ⁺	Indeterminado	57.982	-
	miR-21	E1*	35.316	78.850	-
			34.930	79.609	64.471
		C(-) ⁺	Indeterminado	58.230	-
53°C	miR-16	E1*	32.363	79.361	-
			32.670	79.36	-
		C(-) ⁺	Indeterminado	62.735	-
	miR-21	E1*	35.896	79.361	65.71
			34.947	78.369	64.781
		C(-) ⁺	Indeterminado	62.736	-

*La muestra E1 empleada hace referencia a la muestra descrita en la Tabla 3.

⁺ Control negativo de la amplificación, con todos los reactivos del mix pero sin muestra de ADNc.

Por lo tanto, teniendo en cuenta lo mostrado en la Tabla 10, 51°C fue la T° de hibridación con la que el amplicon de miR-16 exosomal plasmático obtiene un menor valor de Ct, mostrando una congruencia con lo abundancia que este microARN tiene en muestras de plasma (Liu et al., 2016). Cabe mencionar que en ambas T° de hibridación empleadas, los productos amplificados no muestran una 2da T° de Melting, por lo que esta variable no se tomó a consideración para la determinación de la temperatura de hibridación del cebador de miR-16. En el caso de la amplificación de miR-21 exosomal plasmático, empleando ambas T° de hibridación, los amplicones forman una 2da T° de Melting, exceptuando una de las réplicas de las pruebas a 51°C, así también en promedio se obtuvo un menor valor del Ct (35.123), en comparación con el valor del Ct producido a 53°C (35.423).

4.6. NIVEL DE EXPRESIÓN RELATIVA DE miR-21 EXOSOMAL ASOCIADO AL CG, MEDIANTE RT-qPCR.

El nivel de expresión de miR-21 se evaluó mediante la técnica RT-qPCR, a través de los valores de Ct de los amplicones obtenidos a partir de las muestras de ADNc de los microARNs exosomales plasmáticos de los PC en comparación con los IS (ANEXO 8). El análisis se realizó mediante cuantificación relativa usando la expresión de miR-16 como control interno para normalizar las variaciones causadas por diferencias en la concentración de las muestras, de esta manera se comprobó que los valores de Ct de este microARN no mostraron diferencias significativas entre las muestras de PC e IS ($P = 0.0519$, prueba de U de Mann-Whitney). Con el empleo del método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001) se obtuvo la tasa del nivel de expresión relativa promedio del microARN miR-21 exosomal plasmático normalizado (ANEXO 9), esto se representó en el histograma de la Figura 15, el cual muestra una sobreexpresión relativa diferencial significativa en las muestras de los PC (en comparación con las muestras tomadas como control obtenidas a partir de los IS (PC vs. IS, 11.184 vs. 1.104, $P = 0.0043$).

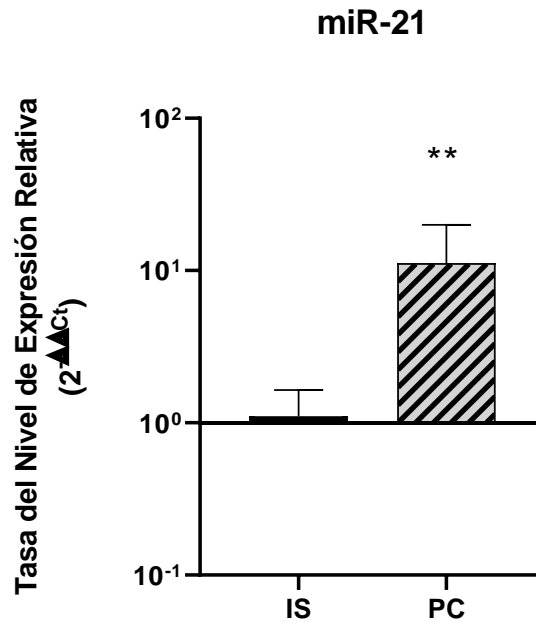


Figura 15: Tasa del nivel de expresión relativa promedio de miR-21 exosomal asociado al CG. Graficado a una escala logarítmica (base 10). Un asterisco significa $P < 0.033$ y dos asteriscos significa $P < 0.002$.

La especificidad de los productos o amplicones de PCR empleados en el anterior análisis se validó con los análisis de la curva de Melting o de Disociación y adicionalmente mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Estos resultados se pueden observar en el ANEXO 9. En la mayoría de amplicones, sólo se encontró una T° de melting, pero hubo algunos casos de amplicones donde sí se obtuvo una 2da T° de melting, por lo que se procedió a analizar los mismos mediante electroforesis observándose sólo 01 banda correspondiente a los amplicones amplificados de PC7, PC9 y PC10, con diferencias en la distancia de migración en el gel para amplicones de miR-16 (100pb aproximadamente) y miR-21 (75pb aproximadamente). En el presente estudio, como ya se ha descrito, los productos de PCR de miR-16 y miR-21 exosomal plasmático se produjeron a partir de las muestras de ADNc diana de PC e IS, que se obtuvieron mediante la poliadenilación (poli-A) de los pequeños ARNs en su extremo 3', su posterior transcripción reversa y síntesis de la primera cadena de ADNc, esto se produjo gracias al empleo de un cebador con una secuencia de unión a poli-A, rico en T en su extremo 3' y bases adicionales en el extremo 5' que conforman una etiqueta de secuencia universal adicional en cada ADNc que se sintetiza, lo cual podría desencadenar la desalineación o la formación de estructuras secundarias en los amplicones y por ende la disociación de los mismos en múltiples fases en el análisis de curva de Melting, obteniéndose ocasionalmente dos T° de Melting en un mismo amplicón. La suposición de que la disociación del ADNc se

basa en un evento de 2 estados ADN simple cadena (ADNsc) y ADN doble cadena (ADNdc) es un planteamiento que puede reevaluarse (Downey, 2017). La posibilidad de que el ADNc amplificado pueda estar asumiendo un estado intermedio podría suceder cuando hay regiones del amplicón que son más estables (p. ej., ricas en G/C), que no se desnaturalizan inmediatamente, pero mantienen su configuración doble cadena hasta que la temperatura sea lo suficientemente alta para disociarlo, lo que da como resultado dos fases. Los factores de secuencia adicionales como la desalineación del amplicón en regiones ricas en A/T y diseños que tienen una estructura secundaria en la región de amplicón, también pueden producir productos que se disocian en múltiples fases (Ahmed et al., 2017).

Tabla 11: Expresión relativa de miR-21 exosomal plasmático y su relación con las características clinicopatológicas de los pacientes con CG

Características	Número de pacientes	Fold Change miR-21 ($\bar{x} \pm ES$)	Valor P
Edad			
≤60	1	2.092±0.000	0.400*
>60	4	13.458±4.136	
Género			
Masculino	2	7.307±4.732	1.000*
Femenino	3	13.770±5.968	
Lugar de procedencia			
Ancash	1	17.473±0.000	0.223 [†]
La Libertad	2	2.333±0.242	
Cajamarca	2	16.891±4.853	
Lugar de residencia			
La Libertad	4	10.971±5.064	1.000*
Cajamarca	1	12.038±0.000	
Nivel de Glucosa			
Normal	3	13.931±4.853	0.400*
Elevado (pre-diabetes)	2	7.065±7.973	
Infección por Helicobacter pylori			
SÍ	1	2.575±0.000	1.000*
No	4	13.337±4.242	
Historia Familiar con Cáncer			
Sí	3	10.695±4.353	1.000*
No	2	11.918±9.826	
Tipo de Cáncer del familiar			
Gástrico	2	14.756±2.717	0.667*

Otros	1	2.575±0.000	
Estadío o Etapa de CG (TNM)			
III	1	17.473±0.000	0.800*
IV	4	9.612±4.647	
Clasificación Lauren			
Intestinal	2	7.307±4.732	1.000*
Difuso	3	13.770±5.968	
Localización del tumor			
Cuerpo	2	19.609±0.000	0.165 [∩]
Cuerpo y Antro	1	2.092±2.136	
Antro y Píloro	2	7.307±4.732	

Nota: Para la presentación de estos datos se tuvo en consideración las características en las que se registraron pacientes en 2 a + categorías.

(*): Prueba estadística de U de Mann–Whitney y (∩): Kruskal–Wallis.

Así mismo, en cuanto a la relación de la expresión de miR-21 de los PC con sus características clinicopatológicas no se encontraron diferencias significativas al compararlas ($p > 0.05$, en todas las características) (véase Tabla 11), lo cual era de esperarse ya que en diversos estudios se reportaron también los mismos resultados tanto para miR-21 exosomal procedente de líquido de lavado peritoneal y de ascitis maligna (Tokuhisa et al., 2015), como para miR-21 circulante de origen sérico (Wang & Zhang, 2012; Wu et al., 2015) y plasmático (Li et al., 2012). Otros estudios sí reportaron diferencias significativas de expresión de miR-21 exosomal de origen sérico (You et al., 2020), miR-21 circulante de origen sérico (Huang et al., 2016) y plasmático (Zheng et al., 2011) en relación a las etapas de CG clasificadas mediante el sistema TNM, evidenciando su utilidad no solo como biomarcador de diagnóstico sino también de pronóstico. No obstante, en nuestra investigación preliminar es probable que no hayamos obtenido resultados semejantes debido al reducido número de muestras (N=5) con el que contábamos, el cual limitó que también tengamos pacientes con CG diagnosticados en diversas etapas del TNM.

De esta manera, recalamos que el resultado obtenido más relevante fue la determinación del nivel de expresión relativa de miR-21 exosomal plasmático con una sobreexpresión diferencial en pacientes con CG en comparación con los IS, conforme con el reciente estudio realizado en suero en el que se halló una alta expresión relativa de miR-21 exosomal sérico en pacientes con CG con respecto a su grupo control (You et al., 2020). Así mismo, Soeda et al., (2019) encontraron una alta expresión de miR-21 exosomal plasmático pero en pacientes con cáncer gástrico

que se sometieron a la resección curativa R0 (extirpación de tumor/nódulos) con y sin recurrencia peritoneal, encontrando claras diferencias entre ambos grupos y demostrando el rol potencial del miR-21 exosomal como biomarcador de recurrencia peritoneal; de igual manera Tokuhisa et al. (2015), hallaron una alta expresión de miR-21 exosomal asociado con la invasión serosa en CG pero a partir del líquido de lavado peritoneal, identificando a miR-21 exosomal como un microARN oncogénico sobre todo relacionado a la formación de metástasis por lo que además puede ser empleado como un biomarcador de pronóstico, esta información es relevante ya que las muestras de pacientes con CG que logramos conseguir eran pacientes que se encontraban en las últimas etapas del cáncer localmente avanzado (Etapa III/IV). Por otro lado, una de las investigaciones que relaciona al miR-21 circulante plasmático y el CG, es la tesis realizada en nuestro país en el año 2017, donde también se identificó a miR-21 como un microARN oncogénico y encontrándose con una mayor expresión significativa en muestras de pacientes con CG, tanto en muestras de plasma como de suero (Cedrón, 2017).

Finalmente, es preciso mencionar a pesar de la naturaleza preliminar de estos resultados, se reporta el primer hallazgo de los niveles de expresión de miR-21 exosomal proveniente de plasma sanguíneo de pacientes con CG; así mismo, este trabajo da continuidad a uno de los primeros estudios realizados en el país sobre microARNs asociados al cáncer gástrico, lo cual también allana el camino para que se sigan desarrollando nuevas investigaciones con un mayor número muestral y pools de microARNs exosomales teniendo en cuenta la metodología y recomendaciones planteadas en este estudio con el propósito de generar nuevos aportes en investigación aplicada y se pueda poco a poco validar la utilidad de los microARNs a nivel clínico.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- El método de extracción de microARNs exosomales a partir de plasma sanguíneo estandarizado permitió obtener concentraciones de ARNs pequeños exosomales totales mayores de 14.6 ng/uL, lo cual representa un mayor rendimiento del protocolo de extracción modificado a comparación del protocolo original con el cual, según los reportes, se obtuvieron concentraciones menores a 5 ng/uL.
- El protocolo de amplificación de microARNs exosomales, con el que se obtuvieron los valores de Ct congruentes con la abundancia reportada de los microARNs miR-21 y miR-16, se implementó para determinar el nivel de expresión relativa del miR-21 exosomal plasmático asociado al CG.
- El nivel de la expresión relativa del microARN miR-21 exosomal plasmático determinado mostró una sobreexpresión significativa ($P = 0.0043$) en pacientes con CG (PC) en comparación con los individuos sanos (IS).
- Teniendo en cuenta la naturaleza preliminar del estudio, se reportó el primer hallazgo del microARN miR-21 exosomal en plasma como potencial biomarcador no invasivo para la detección del CG, además de métodos estandarizados para su replicación en nuevos estudios, abriendo una nueva oportunidad para desarrollar una herramienta no invasiva para el diagnóstico temprano y/o pronóstico de enfermedades recurrentes en nuestro país.

5.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar más estudios para validar la sobreexpresión de los niveles de expresión de miR-21 exosomal plasmático con un número muestral más grande para verificar su utilidad como biomarcadores de CG, así como con pacientes categorizados en las diversas etapas del TNM, para determinar su relación con esta como con otras características clinicopatológicas.
- Así también se recomienda replicar las metodologías estandarizadas para determinar un pool de microARNs específicos para diagnóstico y/o pronóstico de CG, el cual pueda ser empleado como parte de la rutina clínica y permita ampliar las estrategias terapéuticas a seguir.
- Para próximas investigaciones en este campo se recomienda programar la compra de todos los materiales e insumos con antelación y holgura de tiempo para evitar cualquier contratiempo con las empresas proveedoras o los mismos fabricantes.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera-Rojas, M., Sharbati, S., Stein, T., Candela Andrade, M., Kohn, B., & Einspanier, R. (2022). Systematic analysis of different degrees of haemolysis on miRNA levels in serum and serum-derived extracellular vesicles from dogs. *BMC Veterinary Research*, *18*(1), 355. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03445-8>
- Aguirre, A. W. Y., & Giraldez, C. G. (2017). *Detección de microRNAs predichos para Taenia solium en muestras del parásito y sus hospederos*. <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/939>
- Ahmed, F. E., Gouda, M. M., Hussein, L. A., Ahmed, N. C., Vos, P. W., & Mohammad, M. A. (2017). Role of Melt Curve Analysis in Interpretation of Nutrigenomics' MicroRNA Expression Data. *Cancer Genomics & Proteomics*, *14*(6), 469-481.
- Aida, K., Yoshikawa, H., Mochizuki, C., Mori, A., Muto, S., Fukuda, T., & Otsuki, M. (2008). Clinicopathological features of gastric cancer detected by endoscopy as part of annual health checkup. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *23*(4), 632-637. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05346.x>
- American Society for Gastrointestinal Endoscopy. (2003). The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: Esophagus, stomach, and colon: November 30 to December 1, 2002. *Gastrointestinal Endoscopy*, *58*(6 Suppl), S3-43. [https://doi.org/10.1016/s0016-5107\(03\)02159-x](https://doi.org/10.1016/s0016-5107(03)02159-x)
- Amin, M. B., Greene, F. L., Edge, S. B., Compton, C. C., Gershenwald, J. E., Brookland, R. K., Meyer, L., Gress, D. M., Byrd, D. R., & Winchester, D. P. (2017). The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more «personalized» approach to cancer staging. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *67*(2), 93-99. <https://doi.org/10.3322/caac.21388>
- Amr, K. S., Ezzat, W. M., Elhosary, Y. A., Hegazy, A. E., Fahim, H. H., & Kamel, R. R. (2016). The potential role of miRNAs 21 and 199-a in early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Gene*, *575*(1), 66-70. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.038>

- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 5(2), 209-219. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
- Battke, C., Ruiss, R., Welsch, U., Wimberger, P., Lang, S., Jochum, S., & Zeidler, R. (2011). Tumour exosomes inhibit binding of tumour-reactive antibodies to tumour cells and reduce ADCC. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60(5), 639-648. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-0979-5>
- Bebelman, M. P., Smit, M. J., Pegtel, D. M., & Baglio, S. R. (2018). Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 188, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.02.013>
- Becker, C., Hammerle-Fickinger, A., Riedmaier, I., & Pfaffl, M. W. (2010). mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*, 50(4), 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.010>
- Becton Dickinson and Company. (2013). *Guía de uso de Productos BD Vacutainer®*.
- Behrouzian, F., Sadrizadeh, N., Nematpour, S., Seyedian, S. S., Nassiryan, M., & Zadeh, A. J. F. (2017). The Effect of Psychological Preparation on the Level of Anxiety before Upper Gastrointestinal Endoscopy. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 11(7), VC01-VC04. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/24876.10270>
- Bell, E., & Taylor, M. A. (2016). Functional Roles for Exosomal MicroRNAs in the Tumour Microenvironment. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 15, 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.10.005>
- Benson, E. A., & Skaar, T. C. (2013). Incubation of Whole Blood at Room Temperature Does Not Alter the Plasma Concentrations of MicroRNA-16 and -223. *Drug Metabolism and Disposition*, 41(10), 1778-1781. <https://doi.org/10.1124/dmd.113.052357>
- Bernal, C. (2018). *Estudio de los microRNAs miR-126 y miR-375 como potenciales biomarcadores en la prevención y diagnóstico de diabetes tipo 2 en la población peruana* [Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/10033>

- Bhaskaran, M., & Mohan, M. (2014). MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease. *Veterinary Pathology*, 51(4), 759-774. <https://doi.org/10.1177/0300985813502820>
- Bhattacharya, A., Chaturvedi, G., Singhal, K., & Pandey, R. (2020). Chapter 16—Experimental toolkit to study RNA level regulation. En R. Pandey (Ed.), *Rna-Based Regulation in Human Health and Disease* (Vol. 19, pp. 371-396). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817193-6.00016-9>
- Cai, Y., Yu, X., Hu, S., & Yu, J. (2009). A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 7(4), 147-154. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(08\)60044-3](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(08)60044-3)
- Cedrón, V. (2017). *Análisis de microARNs circulantes en el suero y plasma para la detección de los biomarcadores miR-21, miR-106b y let-7a asociados al cáncer gástrico*. [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional de Tumbes.
- Chan, J. K., Blansit, K., Kiet, T., Sherman, A., Wong, G., Earle, C., & Bourguignon, L. Y. W. (2014). The inhibition of miR-21 promotes apoptosis and chemosensitivity in ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 132(3), 739-744. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.01.034>
- Chauhan, D. T. (2019, abril 1). *Real-time PCR: Principle, Procedure, Advantage, Limitations and Applications*. Genetic Education. <https://geneticeducation.co.in/real-time-pcr-principle-procedure-advantages-limitations-and-applications/>
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., Lao, K. Q., Livak, K. J., & Guegler, K. J. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 33(20), e179. <https://doi.org/10.1093/nar/gni178>
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., ... Zhang, C.-Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: A novel class of

- biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, 18(10), Article 10.
<https://doi.org/10.1038/cr.2008.282>
- Cheng, H. H., Yi, H. S., Kim, Y., Kroh, E. M., Chien, J. W., Eaton, K. D., Goodman, M. T., Tait, J. F., Tewari, M., & Pritchard, C. C. (2013). Plasma Processing Conditions Substantially Influence Circulating microRNA Biomarker Levels. *PLoS ONE*, 8(6), e64795.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064795>
- Chevillet, J. R., Kang, Q., Ruf, I. K., Briggs, H. A., Vojtech, L. N., Hughes, S. M., Cheng, H. H., Arroyo, J. D., Meredith, E. K., Gallichotte, E. N., Pogossova-Agadjanyan, E. L., Morrissey, C., Stirewalt, D. L., Hladik, F., Yu, E. Y., Higano, C. S., & Tewari, M. (2014). Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(41), 14888-14893.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1408301111>
- Choi, Y., Choi, H. S., Jeon, W. K., Kim, B. I., Park, D. I., Cho, Y. K., Kim, H. J., Park, J. H., & Sohn, C. I. (2012). Optimal Number of Endoscopic Biopsies in Diagnosis of Advanced Gastric and Colorectal Cancer. *Journal of Korean Medical Science*, 27(1), Article 1.
<https://doi.org/10.3346/jkms.2012.27.1.36>
- Correa, P. (1995). Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis. *The American Journal of Surgical Pathology*, 19 Suppl 1, S37-43.
- Cuellar-Gomez, H., Ocharán-Hernández, M. E., Calzada-Mendoza, C. C., & Comoto-Santacruz, D. A. (2021). Serum miRNA profile as a potential tool for non-invasive gastric cancer diagnosis in Mexican patients. *Cirugía y Cirujanos*, 89(6), 5379.
<https://doi.org/10.24875/CIRU.20000963>
- Cui, J., & Shu, J. (2020). Circulating microRNA trafficking and regulation: Computational principles and practice. *Briefings in Bioinformatics*, 21(4), Article 4.
<https://doi.org/10.1093/bib/bbz079>
- Cui, M., Wang, H., Yao, X., Zhang, D., Xie, Y., Cui, R., & Zhang, X. (2019). Circulating MicroRNAs in Cancer: Potential and Challenge. *Frontiers in Genetics*, 10, 626.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00626>

- Dangwal, S., Bang, C., & Thum, T. (2012). Novel techniques and targets in cardiovascular microRNA research. *Cardiovascular Research*, 93(4), 545-554. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr297>
- Deng, Z.-M., Chen, G.-H., Dai, F.-F., Liu, S.-Y., Yang, D.-Y., Bao, A.-Y., & Cheng, Y.-X. (2022). The clinical value of miRNA-21 in cervical cancer: A comprehensive investigation based on microarray datasets. *PLOS ONE*, 17(4), e0267108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267108>
- Di Leva, G., & Croce, C. M. (2010). Roles of small RNAs in tumor formation. *Trends in molecular medicine*, 16(6), Article 6. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.04.001>
- Dilsiz, N. (2020). Role of exosomes and exosomal microRNAs in cancer. *Future Science OA*, 6(4), FSO465. <https://doi.org/10.2144/fsoa-2019-0116>
- Dong, H., Lei, J., Ding, L., Wen, Y., Ju, H., & Zhang, X. (2013). MicroRNA: Function, Detection, and Bioanalysis. *Chemical Reviews*, 113(8), 6207-6233. <https://doi.org/10.1021/cr300362f>
- Downey, Nick. (2017, febrero 1). *Explaining multiple peaks in qPCR melt curve analysis | IDT*. Integrated DNA Technologies. <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/interpreting-melt-curves-an-indicator-not-a-diagnosis>
- Du, J., Qian, J., Zheng, B., Xu, G., Chen, H., & Chen, C. (2021). MiR-21-5p is a Biomarker for Predicting Prognosis of Lung Adenocarcinoma by Regulating PIK3R1 Expression. *International Journal of General Medicine*, 14, 8873-8880. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S337149>
- Dunlop, R. A., Banack, S. A., & Cox, P. A. (2021). A comparison of the efficiency of RNA extraction from extracellular vesicles using the Qiagen RNeasy MinElute versus Enzymax LLC RNA Tini Spin columns and qPCR of miRNA. *Biology Methods and Protocols*, 6(1), bpab015. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpab015>
- Espejo R., H., & Navarrete S., J. (2003). Clasificación de los Adenocarcinomas de estómago. *Revista de Gastroenterología del Perú*, 23, 199-212.

- Fernández-Messina, L., Gutiérrez-Vázquez, C., Rivas-García, E., Sánchez-Madrid, F., & de la Fuente, H. (2015). Immunomodulatory role of microRNAs transferred by extracellular vesicles. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, *107*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1111/boc.201400081>
- Forero, D. A., González-Giraldo, Y., Castro-Vega, L. J., & Barreto, G. E. (2019). qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs. *BioTechniques*, *67*(4), 192-199. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0065>
- Gallo, A., & Alevizos, I. (2013). Isolation of circulating microRNA in saliva. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1024*, 183-190. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-453-1_14
- García C., C. (2013). Actualización del diagnóstico y tratamiento del cáncer gástrico. *Revista Médica Clínica Las Condes*, *24*(4), 627-636. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(13\)70201-3](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(13)70201-3)
- Ge, Q., Zhou, Y., Lu, J., Bai, Y., Xie, X., & Lu, Z. (2014). MiRNA in Plasma Exosome is Stable under Different Storage Conditions. *Molecules*, *19*(2), 1568-1575. <https://doi.org/10.3390/molecules19021568>
- Gevaert, A. B., Witvrouwen, I., Vrints, C. J., Heidbuchel, H., Craenenbroeck, E. M. V., Laere, S. J. V., & Craenenbroeck, A. H. V. (2018). MicroRNA profiling in plasma samples using qPCR arrays: Recommendations for correct analysis and interpretation. *PLOS ONE*, *13*(2), e0193173. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193173>
- Gohar, S. F., Eldin, S. K., El-Bassal, F., Shehata, A., Azzam, A., Tawfik, E., & Hassanin, S. A. A. (2018). The impact of serum microRNA-21 on outcome of diffuse large B-cell lymphoma patients. *Annals of Oncology*, *29*, viii367. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy286.026>
- Grupo Kepler. (2021, diciembre 3). Recuperación de daños medioambientales PCR y qPCR. *Kepler*. <https://www.kepler.es/tecnica-pcr-qpcr-recuperacion-danos-medioambientales/>
- Gu, Z., Yin, H., Zhang, H., Zhang, H., Liu, X., Zeng, X., & Zheng, X. (2022). Optimization of a method for the clinical detection of serum exosomal miR-940 as a potential biomarker of

- breast cancer. *Frontiers in Oncology*, 12.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.956167>
- Guan, Y., Wu, Y., Liu, Y., Ni, J., & Nong, S. (2016). Association of microRNA-21 expression with clinicopathological characteristics and the risk of progression in advanced prostate cancer patients receiving androgen deprivation therapy. *The Prostate*, 76(11), 986-993.
<https://doi.org/10.1002/pros.23187>
- Gulyaeva, L. F., & Kushlinskiy, N. E. (2016). Regulatory mechanisms of microRNA expression. *Journal of Translational Medicine*, 14(1), 143. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0893-x>
- Hale, M. D., Gotoda, T., Hayden, J. D., & Grabsch, H. I. (2015). Endoscopic biopsies from gastrointestinal carcinomas and their suitability for molecular analysis: A review of the literature and recommendations for clinical practice and research. *Histopathology*, 67(2), 147-157. <https://doi.org/10.1111/his.12626>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hashimoto, Y., Akiyama, Y., & Yuasa, Y. (2013). Multiple-to-Multiple Relationships between MicroRNAs and Target Genes in Gastric Cancer. *PLoS ONE*, 8(5), Article 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062589>
- Healy, N. A., Heneghan, H. M., Miller, N., Osborne, C. K., Schiff, R., & Kerin, M. J. (2012). Systemic mirnas as potential biomarkers for malignancy. *International Journal of Cancer*, 131(10), 2215-2222. <https://doi.org/10.1002/ijc.27642>
- Hochwald, S. N., Kim, S., Klimstra, D. S., Brennan, M. F., & Karpeh, M. S. (2000). Analysis of 154 actual five-year survivors of gastric cancer. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 4(5), 520-525. [https://doi.org/10.1016/S1091-255X\(00\)80095-5](https://doi.org/10.1016/S1091-255X(00)80095-5)
- Hu, B., Hajj, N. E., Sittler, S., Lammert, N., Barnes, R., & Meloni-Ehrig, A. (2012). Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 3(3), 251-261.

- Hu, W.-P., Chen, Y.-C., & Chen, W.-Y. (2020). Improve sample preparation process for miRNA isolation from the culture cells by using silica fiber membrane. *Scientific Reports*, *10*, 21132. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78202-8>
- Huang, S., Wang, J., Li, J., Luo, Q., Zhao, M., Zheng, L., Dong, X., Chen, C., Che, Y., Liu, P., Qi, J., & Huang, C. (2016). Serum microRNA expression profile as a diagnostic panel for gastric cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, *46*(9), 811-818. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyw085>
- Huang, T., Yang, J., Liu, G., Jin, W., Liu, Z., Zhao, S., & Yao, M. (2015). Quantification of Mature MicroRNAs Using Pincer Probes and Real-Time PCR Amplification. *PLoS ONE*, *10*(3), e0120160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120160>
- Huang, X., Yuan, T., Tschannen, M., Sun, Z., Jacob, H., Du, M., Liang, M., Dittmar, R. L., Liu, Y., Liang, M., Kohli, M., Thibodeau, S. N., Boardman, L., & Wang, L. (2013). Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics*, *14*(1), 319. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-319>
- Hunt, E. A., Broyles, D., Head, T., & Deo, S. K. (2015). MicroRNA Detection: Current Technology and Research Strategies. *Annual Review of Analytical Chemistry*, *8*(1), 217-237. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071114-040343>
- Hwang, S. W., Lee, D. H., Lee, S. H., Park, Y. S., Hwang, J. H., Kim, J. W., Jung, S. H., Kim, N. Y., Kim, Y. H., Lee, K. H., Kim, H.-H., Park, D. J., Lee, H. S., Jung, H. C., & Song, I. S. (2010). Preoperative staging of gastric cancer by endoscopic ultrasonography and multidetector-row computed tomography. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *25*(3), 512-518. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2009.06106.x>
- Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos - NCI. (2022, octubre 21). *Información del Cáncer de estómago (PDQ®)* (nciglobal,ncienterprise) [PdqCancerInfoSummary]. <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/estomago/paciente/tratamiento-estomago-pdq>
- IREN - Norte. (2022). *Informe del registro hospitalario del cáncer 2007—2021*.
- Japanese Gastric Cancer Association. (2011). Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer: Official Journal of the International Gastric Cancer*

- Association and the Japanese Gastric Cancer Association*, 14(2), 101-112.
<https://doi.org/10.1007/s10120-011-0041-5>
- Jelski, W., & Mroczko, B. (2022). Molecular and Circulating Biomarkers of Gastric Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14), 7588.
<https://doi.org/10.3390/ijms23147588>
- Jenike, A. E., & Halushka, M. K. (2021). miR-21: A non-specific biomarker of all maladies. *Biomarker Research*, 9, 18. <https://doi.org/10.1186/s40364-021-00272-1>
- Jiang, Q., Lyu, X.-M., Yuan, Y., & Wang, L. (2017). Plasma miR-21 expression: An indicator for the severity of Type 2 diabetes with diabetic retinopathy. *Bioscience Reports*, 37(2), BSR20160589. <https://doi.org/10.1042/BSR20160589>
- Jiang, Y., Zhang, M., Guo, T., Yang, C., Zhang, C., & Hao, J. (2018). MicroRNA-21-5p promotes proliferation of gastric cancer cells through targeting SMAD7. *OncoTargets and Therapy*, 11, 4901-4911. <https://doi.org/10.2147/OTT.S163771>
- Jung, U., Jiang, X., Kaufmann, S. H. E., & Patzel, V. (2013). A universal TaqMan-based RT-PCR protocol for cost-efficient detection of small noncoding RNA. *RNA (New York, N.Y.)*, 19(12), 1864-1873. <https://doi.org/10.1261/rna.040501.113>
- Kalra, H., Drummen, G. P. C., & Mathivanan, S. (2016). Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ijms17020170>
- Kappel, A., & Keller, A. (2017). miRNA assays in the clinical laboratory: Workflow, detection technologies and automation aspects. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 55(5). <https://doi.org/10.1515/cclm-2016-0467>
- Karimi, P., Islami, F., Anandasabapathy, S., Freedman, N. D., & Kamangar, F. (2014). Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 23(5), 700-713. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-13-1057>

- Kim, S. H., MacIntyre, D. A., Sykes, L., Arianoglou, M., Bennett, P. R., & Terzidou, V. (2022). Whole Blood Holding Time Prior to Plasma Processing Alters microRNA Expression Profile. *Frontiers in Genetics*, *12*, 818334. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.818334>
- Kirschner, M. B., Edelman, J. J. B., Kao, S. C.-H., Vallely, M. P., van Zandwijk, N., & Reid, G. (2013). The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers. *Frontiers in Genetics*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00094>
- Kirschner, M. B., Kao, S. C., Edelman, J. J., Armstrong, N. J., Vallely, M. P., van Zandwijk, N., & Reid, G. (2011). Haemolysis during Sample Preparation Alters microRNA Content of Plasma. *PLoS ONE*, *6*(9), Article 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024145>
- Komatsu, S., Ichikawa, D., Tsujiura, M., Konishi, H., Takeshita, H., Nagata, H., Kawaguchi, T., Hirajima, S., Arita, T., Shiozaki, A., Kubota, T., Fujiwara, H., Okamoto, K., & Otsuji, E. (2013). Prognostic impact of circulating miR-21 in the plasma of patients with gastric carcinoma. *Anticancer Research*, *33*(1), 271-276.
- Kotlarek, M., Kubiak, A., Jażdżewski, K., & Wójcicka, A. (2018). MicroRNA Analysis Using the Quantitative Real-Time PCR Reaction. En U. A. V. Ørom (Ed.), *MiRNA Biogenesis: Methods and Protocols* (pp. 69-85). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8624-8_7
- Krichevsky, A. M., & Gabriely, G. (2009). miR-21: A small multi-faceted RNA. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *13*(1), 39-53. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00556.x>
- Kroh, E. M., Parkin, R. K., Mitchell, P. S., & Tewari, M. (2010). Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods (San Diego, Calif.)*, *50*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.032>
- Lan, L., Guo, Q., Nie, H., Zhou, C., Cai, Q., Huang, J., & Meng, X. (2019). Linear-hairpin variable primer RT-qPCR for MicroRNA. *Chemical Science*, *10*(7), 2034-2043. <https://doi.org/10.1039/c8sc04621b>

- Lauren, P. (1965). THE TWO HISTOLOGICAL MAIN TYPES OF GASTRIC CARCINOMA: DIFFUSE AND SO-CALLED INTESTINAL-TYPE CARCINOMA. AN ATTEMPT AT A HISTO-CLINICAL CLASSIFICATION. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica*, 64, 31-49. <https://doi.org/10.1111/apm.1965.64.1.31>
- Layke, J. C., & Lopez, P. P. (2004). Gastric Cancer: Diagnosis and Treatment Options. *American Family Physician*, 69(5), 1133-1141.
- Leal, K., Saavedra, K., Rebolledo, C., & Salazar, L. A. (2021). MicroRNAs hsa-miR-618 and hsa-miR-297 Might Modulate the Pleiotropic Effects Exerted by Statins in Endothelial Cells Through the Inhibition of ROCK2 Kinase: In-silico Approach. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2021.704175>
- Lee, S., Choi, E., Cha, M.-J., Hwang, K.-C., Lee, S., Choi, E., Cha, M.-J., & Hwang, K.-C. (2015). Implications of MicroRNAs in the Vascular Homeostasis and Remodeling. In *Muscle Cell and Tissue*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/60740>
- Li, B., Zhao, Y., Guo, G., Li, W., Zhu, E., Luo, X., Mao, X., Zou, Q., Yu, P., Zuo, Q., Li, N., Tang, B., Liu, K., & Xiao, B. (2012). Plasma microRNAs, miR-223, miR-21 and miR-218, as Novel Potential Biomarkers for Gastric Cancer Detection. *PLoS ONE*, 7(7), e41629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041629>
- Li, X., Wei, Y., & Wang, Z. (2018). MicroRNA-21 and hypertension. *Hypertension Research*, 41(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/s41440-018-0071-z>
- Liao, J., Liu, R., Shi, Y.-J., Yin, L.-H., & Pu, Y.-P. (2016). Exosome-shuttling microRNA-21 promotes cell migration and invasion-targeting PDCD4 in esophageal cancer. *International Journal of Oncology*, 48(6), 2567-2579. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3453>
- Liu, R., Zhang, C., Hu, Z., Li, G., Wang, C., Yang, C., Huang, D., Chen, X., Zhang, H., Zhuang, R., Deng, T., Liu, H., Yin, J., Wang, S., Zen, K., Ba, Y., & Zhang, C.-Y. (2011). A five-microRNA signature identified from genome-wide serum microRNA expression

- profiling serves as a fingerprint for gastric cancer diagnosis. *European Journal of Cancer*, 47(5), 784-791. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.10.025>
- Liu, W., & Saint, D. A. (2002). A New Quantitative Method of Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay Based on Simulation of Polymerase Chain Reaction Kinetics. *Analytical Biochemistry*, 302(1), 52-59. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5530>
- Liu, X., & Chu, K. (2020). Exosomal miRNAs as circulating biomarkers for prediction of development of haematogenous metastasis after surgery for stage II/III gastric cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(11), 6220-6232. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15253>
- Liu, X., Kwong, A., Sihoe, A., & Chu, K.-M. (2016). Plasma miR-940 may serve as a novel biomarker for gastric cancer. *Tumor Biology*, 37(3), 3589-3597. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4019-5>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lu, Z., Liu, M., Stribinskis, V., Klinge, C. M., Ramos, K. S., Colburn, N. H., & Li, Y. (2008). MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene*, 27(31), Article 31. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.72>
- Machida, A., Ohkubo, T., & Yokota, T. (2013). Circulating microRNAs in the cerebrospinal fluid of patients with brain diseases. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1024, 203-209. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-453-1_16
- Mall, C., Rocke, D. M., Durbin-Johnson, B., & Weiss, R. H. (2013). Stability of miRNA in human urine supports its biomarker potential. *Biomarkers in medicine*, 7(4), Article 4. <https://doi.org/10.2217/bmm.13.44>
- Markou, A. N., & Lianidou, E. S. (2019). The Impact of Pre-analytical Factors on the Reliability of miRNA Measurements. *Current Pathobiology Reports*, 7(2), 29-33. <https://doi.org/10.1007/s40139-019-00191-9>

- Mathivanan, S., Ji, H., & Simpson, R. J. (2010). Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. *Journal of Proteomics*, 73(10), Article 10. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.06.006>
- Matsuoka, T., & Yashiro, M. (2018). Biomarkers of gastric cancer: Current topics and future perspective. *World Journal of Gastroenterology*, 24(26), 2818-2832. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i26.2818>
- Matsuyama, H., & Suzuki, H. I. (2020). Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/ijms21010132>
- McDonald, J. S., Milosevic, D., Reddi, H. V., Grebe, S. K., & Algeciras-Schimmich, A. (2011). Analysis of Circulating MicroRNA: Preanalytical and Analytical Challenges. *Clinical Chemistry*, 57(6), 833-840. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.157198>
- McLean, M. H., & El-Omar, E. M. (2014). Genetics of gastric cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(11), 664-674. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.143>
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K. C., Allen, A., Lin, D. W., Urban, N., Drescher, C. W., Knudsen, B. S., Stirewalt, D. L., Gentleman, R., Vessella, R. L., Nelson, P. S., Martin, D. B., & Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(30), 10513-10518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105>
- Motta, A. P. (2020). *Evaluación de los niveles de miRNA-145 circulante en plasma de mujeres peruanas y análisis metabólico in silico en cáncer* [Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/15922>
- Mulberry, G., White, K., Vaidya, M., Sugaya, K., & Kim, B. (2017). 3D printing and milling a real-time PCR device for infectious disease diagnostics. *PLoS ONE*, 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179133>

- Mulcahy, L. A., Pink, R. C., & Carter, D. R. F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>
- Muller, P. Y., Janovjak, H., Miserez, A. R., & Dobbie, Z. (2002). Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques*, 32(6), 1372-1374, 1376, 1378-1379.
- National Cancer Institute. (2021). *Cancer of the Stomach—Cancer Stat Facts*. SEER. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/stomach.html>
- Nguyen, H. T., Kacimi, S. E. O., Nguyen, T. L., Suman, K. H., Lemus-Martin, R., Saleem, H., & Do, D. N. (2021). MiR-21 in the Cancers of the Digestive System and Its Potential Role as a Diagnostic, Predictive, and Therapeutic Biomarker. *Biology*, 10(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/biology10050417>
- Nishitani, M., Yoshida, N., Tsuji, S., Masunaga, T., Hirai, H., Miyajima, S., Dejima, A., Nakashima, T., Wakita, S., Takemura, K., Minato, H., Kaneko, S., & Doyama, H. (2019). Optimal number of endoscopic biopsies for diagnosis of early gastric cancer. *Endoscopy International Open*, 7(12), E1683-E1690. <https://doi.org/10.1055/a-1007-1730>
- Oh, S., Park, M. R., Son, S. J., & Kim, Y. (2015). Comparison of Total RNA Isolation Methods for Analysis of Immune-Related microRNAs in Market Milks. *Food Science of Animal Resources*, 35(4), Article 4. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2015.35.4.459>
- Page, K., Guttery, D. S., Zahra, N., Primrose, L., Elshaw, S. R., Pringle, J. H., Blighe, K., Marchese, S. D., Hills, A., Woodley, L., Stebbing, J., Coombes, R. C., & Shaw, J. A. (2013). Influence of Plasma Processing on Recovery and Analysis of Circulating Nucleic Acids. *PLoS ONE*, 8(10), e77963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077963>
- Park, J. Y., Karsa, L. von, & Herrero, R. (2014). Prevention Strategies for Gastric Cancer: A Global Perspective. *Clinical Endoscopy*, 47(6), 478-489. <https://doi.org/10.5946/ce.2014.47.6.478>
- Penfornis, P., Vallabhaneni, K. C., Whitt, J., & Pochampally, R. (2016). Extracellular vesicles as carriers of microRNA, proteins and lipids in tumor microenvironment. *International journal of cancer*, 138(1), Article 1. <https://doi.org/10.1002/ijc.29417>

- Piazuelo, M. B., & Correa, P. (2013). Cáncer Gastrico: Punto de vista. *Colombia Médica*, 44.
- Pizzamiglio, S., Zanutto, S., Ciniselli, C. M., Belfiore, A., Bottelli, S., Gariboldi, M., & Verderio, P. (2017). A methodological procedure for evaluating the impact of hemolysis on circulating microRNAs. *Oncology Letters*, 13(1), 315-320. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5452>
- Poel, D., Buffart, T. E., Oosterling-Jansen, J., Verheul, H. M., & Voortman, J. (2018). Evaluation of several methodological challenges in circulating miRNA qPCR studies in patients with head and neck cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.288>
- Pozniak, T., Shcharbin, D., & Bryszewska, M. (2022). Circulating microRNAs in Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/ijms23073996>
- Prediger, Ellen. (2018, agosto 20). *How to design primers and probes for PCR and qPCR / IDT*. Integrated DNA Technologies. <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/designing-pcr-primers-and-probes>
- Qiagen Sample & Assay Technologies. (2012). *MiRNeasy Serum/Plasma Handbook*. <https://www.qiagen.com/fi/resources/resourcedetail?id=710c0168-e408-408b-95af-91df5b5b1dd6&lang=en>
- Qiu, X., Zhang, J., Shi, W., Liu, S., Kang, M., Chu, H., Wu, D., Tong, N., Gong, W., Tao, G., Zhao, Q., Qiang, F., Zhu, H., Wu, Q., Wang, M., & Zhang, Z. (2016). Circulating MicroRNA-26a in Plasma and Its Potential Diagnostic Value in Gastric Cancer. *PLOS ONE*, 11(3), e0151345. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151345>
- Ramachandran, S., & Palanisamy, V. (2012). Horizontal Transfer of RNAs: Exosomes as mediators of intercellular communication. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 3(2), Article 2. <https://doi.org/10.1002/wrna.115>

- Ricci, C., Holton, J., & Vaira, D. (2007). Diagnosis of *Helicobacter pylori*: Invasive and non-invasive tests. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, *21*(2), 299-313. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2006.11.002>
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(5), 5451-5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
- Salvianti, F., Gelmini, S., Costanza, F., Mancini, I., Sonnati, G., Simi, L., Pazzagli, M., & Pinzani, P. (2020). The pre-analytical phase of the liquid biopsy. *New Biotechnology*, *55*, 19-29. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.09.006>
- Schmittgen, T. D., Lee, E. J., Jiang, J., Sarkar, A., Yang, L., Elton, T. S., & Chen, C. (2008). Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods (San Diego, Calif.)*, *44*(1), 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.09.006>
- Schneider, J., & Schulze, G. (2003). Comparison of tumor M2-pyruvate kinase (tumor M2-PK), carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigens CA 19-9 and CA 72-4 in the diagnosis of gastrointestinal cancer. *Anticancer research*. [https://www.semanticscholar.org/paper/Comparison-of-tumor-M2-pyruvate-kinase-\(tumor-CA-CA-Schneider-Schulze/27a4e013d599251c02ff2eacea4766c612de8dff](https://www.semanticscholar.org/paper/Comparison-of-tumor-M2-pyruvate-kinase-(tumor-CA-CA-Schneider-Schulze/27a4e013d599251c02ff2eacea4766c612de8dff)
- Schwarzenbach, H. (2014). Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *CLINICAL ONCOLOGY*, *11*, 145-156. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.5>
- Schwarzenbach, H. (2018). Methods for quantification and characterization of microRNAs in cell-free plasma/serum, normal exosomes and tumor-derived exosomes. *Translational Cancer Research*, *7*(S2), S253-S263. <https://doi.org/10.21037/tcr.2017.09.50>
- Sekar, D., Krishnan, R., Thirugnanasambantham, K., Rajasekaran, B., Islam, V. I. H., & Sekar, P. (2016). Significance of microRNA 21 in gastric cancer. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, *40*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2016.02.010>
- Sekovanić, A., Pašalić, D., Orct, T., Piasek, M., Mioč, T., Stasenko, S., Kovačić, J., Jurasović, J., & Dorotić, A. (2021). Pre-amplification as a method for improvement of quantitative RT-

- PCR analysis of circulating miRNAs. *Biochemia Medica*, 31(1), 143-148.
<https://doi.org/10.11613/BM.2021.010901>
- Sereno, M., Aguayo, C., Guillén Ponce, C., Gómez-Raposo, C., Zambrana, F., Gómez-López, M., & Casado, E. (2011). Gastric tumours in hereditary cancer syndromes: Clinical features, molecular biology and strategies for prevention. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 13(9), 599-610. <https://doi.org/10.1007/s12094-011-0705-y>
- Shah, J. S., Soon, P. S., & Marsh, D. J. (2016). Comparison of Methodologies to Detect Low Levels of Hemolysis in Serum for Accurate Assessment of Serum microRNAs. *PLOS ONE*, 11(4), e0153200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153200>
- Shi, J. (2016). Considering Exosomal miR-21 as a Biomarker for Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 5(4), 42. <https://doi.org/10.3390/jcm5040042>
- Shi, R., & Chiang, V. L. (2005). Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *BioTechniques*, 39(4), 519-525. <https://doi.org/10.2144/000112010>
- Shiotani, A., Murao, T., Kimura, Y., Matsumoto, H., Kamada, T., Kusunoki, H., Inoue, K., Uedo, N., Iishi, H., & Haruma, K. (2013). Identification of serum miRNAs as novel non-invasive biomarkers for detection of high risk for early gastric cancer. *British Journal of Cancer*, 109(9), 2323-2330. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.596>
- Simionescu, N., Niculescu, L. S., Sanda, G. M., Margina, D., & Sima, A. V. (2014). Analysis of circulating microRNAs that are specifically increased in hyperlipidemic and/or hyperglycemic sera. *Molecular Biology Reports*, 41(9), 5765-5773. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3449-2>
- Smith, M. D., Leemaqz, S. Y., Jankovic-Karasoulos, T., McAninch, D., McCullough, D., Breen, J., Roberts, C. T., & Pillman, K. A. (2022). Haemolysis Detection in MicroRNA-Seq from Clinical Plasma Samples. *Genes*, 13(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/genes13071288>

- Sociedad Americana contra el Cáncer. (2017, diciembre 14). *¿Qué es el cáncer de estómago?* Cancer. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-estomago/acerca/que-es-el-cancer-de-estomago.html>
- Soeda, N., Iinuma, H., Suzuki, Y., Tsukahara, D., Midorikawa, H., Igarashi, Y., Kumata, Y., Horikawa, M., Kiyokawa, T., Fukagawa, T., & Fukushima, R. (2019). Plasma exosome-encapsulated microRNA-21 and microRNA-92a are promising biomarkers for the prediction of peritoneal recurrence in patients with gastric cancer. *Oncology Letters*, *18*(5), 4467-4480. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10807>
- Sohel, M. H. (2016). Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. *Achievements in the Life Sciences*, *10*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.als.2016.11.007>
- Song, J., Bai, Z., Han, W., Zhang, J., Meng, H., Bi, J., Ma, X., Han, S., & Zhang, Z. (2012). Identification of Suitable Reference Genes for qPCR Analysis of Serum microRNA in Gastric Cancer Patients. *Digestive Diseases and Sciences*, *57*(4), 897-904. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-1981-7>
- Sugita, B. M., Pereira, S. R., de Almeida, R. C., Gill, M., Mahajan, A., Duttargi, A., Kirolikar, S., Fadda, P., de Lima, R. S., Urban, C. A., Makambi, K., Madhavan, S., Boca, S. M., Gusev, Y., Cavalli, I. J., Ribeiro, E. M. S. F., & Cavalli, L. R. (2019). Integrated copy number and miRNA expression analysis in triple negative breast cancer of Latin American patients. *Oncotarget*, *10*(58), 6184-6203. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27250>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Suzuki, K., Yamaguchi, T., Kohda, M., Tanaka, M., Takemura, H., Wakita, M., Tabe, Y., Kato, S., Nasu, M., Hashimoto, T., Mine, S., Serizawa, N., Tomishima, K., Nagahara, A., Matsuda, T., Yamaji, T., Tsugane, S., Saito, Y., Daiko, H., ... Nishizawa, T. (2022). Establishment of preanalytical conditions for microRNA profile analysis of clinical

- plasma samples. *PLOS ONE*, 17(12), e0278927.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278927>
- Szymendera, J. J. (1986). Clinical usefulness of three monoclonal antibody-defined tumor markers: CA 19-9, CA 50, and CA 125. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 7(5-6), 333-342.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Tang, Y.-T., Huang, Y.-Y., Zheng, L., Qin, S.-H., Xu, X.-P., An, T.-X., Xu, Y., Wu, Y.-S., Hu, X.-M., Ping, B.-H., & Wang, Q. (2017). Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *International Journal of Molecular Medicine*, 40(3), 834-844. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3080>
- Tatsuta, M., Itoh, T., Okuda, S., Yamamura, H., Baba, M., & Tamura, H. (1980). Carcinoembryonic antigen in gastric juice as an aid in diagnosis of early gastric cancer. *Cancer*, 46(12), 2686-2692. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19801215\)46:12<2686::AID-CNCR2820461225>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19801215)46:12<2686::AID-CNCR2820461225>3.0.CO;2-E)
- Tokuhisa, M., Ichikawa, Y., Kosaka, N., Ochiya, T., Yashiro, M., Hirakawa, K., Kosaka, T., Makino, H., Akiyama, H., Kunisaki, C., & Endo, I. (2015). Exosomal miRNAs from Peritoneum Lavage Fluid as Potential Prognostic Biomarkers of Peritoneal Metastasis in Gastric Cancer. *PLoS ONE*, 10(7), e0130472.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130472>
- Tsai, M.-M., Wang, C.-S., Tsai, C.-Y., Huang, C.-G., Lee, K.-F., Huang, H.-W., Lin, Y.-H., Chi, H.-C., Kuo, L.-M., Lu, P.-H., & Lin, K.-H. (2016). Circulating microRNA-196a/b are novel biomarkers associated with metastatic gastric cancer. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 64, 137-148. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.05.007>
- Tsukamoto, M., Iinuma, H., Yagi, T., Matsuda, K., & Hashiguchi, Y. (2017). Circulating Exosomal MicroRNA-21 as a Biomarker in Each Tumor Stage of Colorectal Cancer. *Oncology*, 92(6), 360-370. <https://doi.org/10.1159/000463387>

- Ubilla, C. G., Prado, Y., Angulo, J., Obreque, I., Paez, I., Saavedra, N., Saavedra, K., Zambrano, T., & Salazar, L. A. (2021). MicroRNA-33b is a Potential Non-Invasive Biomarker for Response to Atorvastatin Treatment in Chilean Subjects With Hypercholesterolemia: A Pilot Study. *Frontiers in Pharmacology*, *12*.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.674252>
- Valladares-Ayerbes, M., Reboredo, M., Medina-Villaamil, V., Iglesias-Díaz, P., Lorenzo-Patiño, M. J., Haz, M., Santamarina, I., Blanco, M., Fernández-Tajes, J., Quindós, M., Carral, A., Figueroa, A., Antón-Aparicio, L. M., & Calvo, L. (2012). Circulating miR-200c as a diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer. *Journal of Translational Medicine*, *10*(1), 186. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-186>
- Ventura, A., & Jacks, T. (2009). miRNAs and Cancer: A little RNA goes a long way. *Cell*, *136*(4), 586-591. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.005>
- Wang, B. (2013). Base Composition Characteristics of Mammalian miRNAs. *Journal of Nucleic Acids*, *2013*, 951570. <https://doi.org/10.1155/2013/951570>
- Wang, B., & Zhang, Q. (2012). The expression and clinical significance of circulating microRNA-21 in serum of five solid tumors. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *138*(10), Article 10. <https://doi.org/10.1007/s00432-012-1244-9>
- Wang, H., Hou, L., Li, A., Duan, Y., Gao, H., & Song, X. (2014). Expression of Serum Exosomal MicroRNA-21 in Human Hepatocellular Carcinoma. *BioMed Research International*, *2014*, 864894. <https://doi.org/10.1155/2014/864894>
- Wang, H., Tan, Z., Hu, H., Liu, H., Wu, T., Zheng, C., Wang, X., Luo, Z., Wang, J., Liu, S., Lu, Z., & Tu, J. (2019). MicroRNA-21 promotes breast cancer proliferation and metastasis by targeting LZTFL1. *BMC Cancer*, *19*, 738. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5951-3>
- Wang, J., Jiang, Y., Zhan, W., Ye, S., Li, T., & Zhang, J. (2022). Screening of Serum Exosomal miRNAs as Diagnostic Biomarkers for Gastric Cancer Using Small RNA Sequencing. *Journal of Oncology*, *2022*, 5346563. <https://doi.org/10.1155/2022/5346563>

- Winther, M., Alsner, J., Tramm, T., Baeksgaard, L., Holtved, E., & Nordsmark, M. (2015). Evaluation of miR-21 and miR-375 as prognostic biomarkers in esophageal cancer. *Acta Oncologica*, 54(9), 1582-1591. <https://doi.org/10.3109/0284186X.2015.1064161>
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1), 75-85. <https://doi.org/10.2144/05391RV01>
- Wu, J., Li, G., Wang, Z., Yao, Y., Chen, R., Pu, X., & Wang, J. (2015). Circulating MicroRNA-21 Is a Potential Diagnostic Biomarker in Gastric Cancer. *Disease Markers*, 2015, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2015/435656>
- Wu, K., Li, L., & Li, S. (2015). Circulating microRNA-21 as a biomarker for the detection of various carcinomas: An updated meta-analysis based on 36 studies. *Tumor Biology*, 36(3), 1973-1981. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2803-2>
- Wu, W. K. K., Lee, C. W., Cho, C. H., Fan, D., Wu, K., Yu, J., & Sung, J. J. Y. (2010). MicroRNA dysregulation in gastric cancer: A new player enters the game. *Oncogene*, 29(43), Article 43. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.352>
- Xu, L., Wu, Z., Chen, Y., Zhu, Q., Hamidi, S., & Navab, R. (2014). MicroRNA-21 (miR-21) Regulates Cellular Proliferation, Invasion, Migration, and Apoptosis by Targeting PTEN, RECK and Bcl-2 in Lung Squamous Carcinoma, Gejiu City, China. *PLoS ONE*, 9(8), e103698. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103698>
- Yakirevich, E., & Resnick, M. B. (2013). Pathology of gastric cancer and its precursor lesions. *Gastroenterology Clinics of North America*, 42(2), 261-284. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2013.01.004>
- Yang, C., & Robbins, P. D. (2011). The Roles of Tumor-Derived Exosomes in Cancer Pathogenesis. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011, 842849. <https://doi.org/10.1155/2011/842849>
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R.-M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Silva, A. C., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... Wever, O. D.

- (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- Yareta, J., Galarza, M., Capristano, S., Pellón, O., Sánchez, C., Ballon, J., Guio, H., Yareta, J., Galarza, M., Capristano, S., Pellón, O., Sánchez, C., Ballon, J., & Guio, H. (2020). Expresión diferencial de micro-ARN circulantes en pacientes con tuberculosis activa y latente. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 37(1), 51-56. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2020.371.4468>
- Yareta, J. L. (2018). *Validación de un perfil de microARNs para el diagnóstico diferencial de Tuberculosis Latente y Tuberculosis Activa*. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.
- Yin, C., Zhou, X., Dang, Y., Yan, J., & Zhang, G. (2015). Potential Role of Circulating MiR-21 in the Diagnosis and Prognosis of Digestive System Cancer. *Medicine*, 94(50), e2123. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002123>
- You, C., Jin, L., Xu, Q., Shen, B., Jiao, X., & Huang, X. (2019). Expression of miR-21 and miR-138 in colon cancer and its effect on cell proliferation and prognosis. *Oncology Letters*, 17(2), 2271-2277. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9864>
- You H., Ding Y., & Zhou Y. (2020). Expression of serum exosomal miRNA-21 and its clinical significance in gastric cancer. *Chinese Journal of General Surgery*, 223-227.
- Zaborowski, M. P., Balaj, L., Breakefield, X. O., & Lai, C. P. (2015). Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience*, 65(8), Article 8. <https://doi.org/10.1093/biosci/biv084>
- Zeng, Z., Wang, J., Zhao, L., Hu, P., Zhang, H., Tang, X., He, D., Tang, S., & Zeng, Z. (2013). Potential Role of microRNA-21 in the Diagnosis of Gastric Cancer: A Meta-Analysis. *PLOS ONE*, 8(9), e73278. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073278>
- Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., & Mi, S. (2015). Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.02.001>

- Zhao, K., Liang, G., Sun, X., & Guan, L. L. (2016). Comparative miRNAome analysis revealed different miRNA expression profiles in bovine sera and exosomes. *BMC Genomics*, *17*, 630. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2962-1>
- Zhao, Y., & Srivastava, D. (2007). A developmental view of microRNA function. *Trends in Biochemical Sciences*, *32*(4), 189-197. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.02.006>
- Zheng, Y., Cui, L., Sun, W., Zhou, H., Yuan, X., Huo, M., Chen, J., Lou, Y., & Guo, J. (2011). MicroRNA-21 is a new marker of circulating tumor cells in gastric cancer patients. *Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers*, *10*(2), Article 2. <https://doi.org/10.3233/CBM-2011-0231>
- Zhou, B., Wang, D., Sun, G., Mei, F., Cui, Y., & Xu, H. (2018). Effect of miR-21 on Apoptosis in Lung Cancer Cell Through Inhibiting the PI3K/ Akt/NF- κ B Signaling Pathway in Vitro and in Vivo. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *46*(3), 999-1008. <https://doi.org/10.1159/000488831>
- Zhou, X., Zhu, W., Li, H., Wen, W., Cheng, W., Wang, F., Wu, Y., Qi, L., Fan, Y., Chen, Y., Ding, Y., Xu, J., Qian, J., Huang, Z., Wang, T., Zhu, D., Shu, Y., & Liu, P. (2015). Diagnostic value of a plasma microRNA signature in gastric cancer: A microRNA expression analysis. *Scientific Reports*, *5*(1), 11251. <https://doi.org/10.1038/srep11251>
- Ziegler, K., Sanft, C., Zimmer, T., Zeitz, M., Felsenberg, D., Stein, H., Germer, C., Deutschmann, C., & Riecken, E. O. (1993). Comparison of computed tomography, endosonography, and intraoperative assessment in TN staging of gastric carcinoma. *Gut*, *34*(5), 604-610. <https://doi.org/10.1136/gut.34.5.604>

VII. ANEXOS

ANEXO 1: CLASIFICACIÓN DE ESTADIOS DE CÁNCER GÁSTRICO SEGÚN TNM

Etapa AJCC	Agrupamiento para establecer la etapa	Descripción de la etapa
0	Tis	<p>Hay displasia de alto grado (células de aspecto muy anormal) en el revestimiento del estómago o hay células cancerosas sólo en la capa superior de las células de la mucosa (la capa más interna del estómago), y no han crecido hacia las capas más profundas de tejido, tal como la lámina propia (Tis). Esta etapa también se conoce como carcinoma in situ (Tis).</p> <p>No hay propagación a los ganglios linfáticos cercanos (N0) ni a sitios distantes (M0).</p>
	N0	
	M0	
I	T1	<p>El tumor creció desde la capa superior de las células de la mucosa hacia las próximas capas inferiores, tal como la lámina propia, la capa muscular de la mucosa (muscularis mucosae) o la submucosa (T1).</p> <p>No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).</p>
	N0	
	M0	<p>El cáncer está creciendo hasta la muscularis propia (T2).</p> <p>No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).</p>
	T2	
IIA	T1	<p>El tumor creció desde la capa superior de las células de la mucosa hacia las próximas capas inferiores, tal como la lámina propia, la capa muscular de la mucosa (muscularis mucosae) o la submucosa (T1).</p> <p>El cáncer se ha propagado a entre 1 o 2 ganglios linfáticos adyacentes (N1, N2 o N3), ni a sitios distantes (M0).</p>
	N1, N2 o N3	
	M0	<p>El cáncer está creciendo hasta la muscularis propia (T2).</p> <p>El cáncer se ha propagado a entre 1 o 2 ganglios linfáticos adyacentes (N1, N2 o N3).</p> <p>No se ha propagado a sitios distantes (M0).</p>
	T2	
N1, N2 o N3		
M0		

IIB	T3 N0 M0	El cáncer penetra el tejido conectivo subseroso sin invasión de la víscera del peritoneo o estructuras adyacentes (T3) y se ha propagado a entre 1 y 2 ganglios linfáticos adyacentes (N0), pero no a sitios distantes (M0).
	T4a N0 M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del estómago hacia la serosa (peritoneo visceral), pero no ha crecido hacia ningún órgano o estructura adyacente (T4a) No se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (N0), ni a sitios distantes (M0).
III	T3 N1, N2 o N3 M0	El cáncer penetra el tejido conectivo subseroso sin invasión de la víscera del peritoneo o estructuras adyacentes (T3) El cáncer se ha propagado a entre 1 o 2 ganglios linfáticos adyacentes (N1, N2 o N3) No se ha propagado a sitios distantes (M0).
	T4a N1, N2 o N3 M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del estómago hacia la serosa (peritoneo visceral), pero no ha crecido hacia ningún órgano o estructura adyacente (T4a) y se ha propagado a entre 1 o 2 ganglios linfáticos adyacentes (N1, N2 o N3), pero no a sitios distantes (M0).
IVA	T4b N1, N2 o N3 M0	El cáncer ha crecido a través de la pared del estómago hacia órganos o estructuras adyacentes (T4b) y se ha propagado a entre 1 o 2 ganglios linfáticos adyacentes (N1, N2 o N3), pero no a sitios distantes (M0).
IVB	Cualquier T Cualquier N M1	El cáncer puede crecer hacia cualquiera de las capas (Cualquier T) y podría o no haberse propagado a los ganglios linfáticos adyacentes (Cualquier N). Se ha propagado a órganos distantes como el hígado, los pulmones, el cerebro o el peritoneo (la membrana que recubre el espacio alrededor de los órganos del sistema digestivo) (M1).

ANEXO 2: FICHA CLÍNICA DE REGISTRO DE PARTICIPANTES



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

Escuela Profesional de Biotecnología

PROYECTO DE TESIS

“Nivel de expresión relativa del microARN circulante miR-21 como biomarcador asociado al cáncer gástrico en la zona norte del Perú”

FICHA CLÍNICA DE REGISTRO DE PARTICIPANTES

Fecha: _____

I. DATOS GENERALES:

- Código de participante: _____
- Edad: _____
- Sexo: _____
- Lugar de Procedencia: _____
- Lugar de Residencia: _____

II. ANTECEDENTES:

- Fumador: NO , Leve , Moderado o Severo
 - Fumador leve: consume menos de 5 cigarrillos diarios.
 - Fumador moderado: fuma un promedio de 6 a 15 cigarrillos diarios.
 - Fumador severo: fuma más de 16 cigarrillos por día en promedio.
- Última fecha en la que se realizó un análisis de glucosa y resultado obtenido:

- Diagnosticado con Diabetes Mellitus: SI o NO
- Padece de hipertensión: SI o NO
- Última fecha en la que se realizó un análisis de perfil lipídico y resultado obtenido:

III. ANTECEDENTES RELACIONADOS CON CG:

- Historia Familiar con Cáncer: SI o NO , si la respuesta es afirmativa indicar el tipo de cáncer: _____
- Examen de endoscopia alta: SI o NO , si la respuesta es afirmativa indicar conclusión del examen: _____
- Infección por *H. Pylori*: SI o NO
- Diagnóstico de CG: SI o NO , si la respuesta es afirmativa indicar tipo de prueba diagnóstica utilizada _____ y continuar con el registro de los siguientes ítems.
- Tipo de CG: _____
- Etapa de CG (Sistema TNM): _____
- Cirugía: SI o NO _____
- Tratamiento: SI o NO _____

ANEXO 3: CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACION EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

Escuela Profesional de Biotecnología

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACION EN EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

INFORMACIÓN:

El cáncer gástrico (CG) es una enfermedad neoplásica agresiva que continúa teniendo un impacto perjudicial en la salud mundial. Según el censo denominado GLOBOCAN-2012, el CG en nuestro país es la segunda neoplasia maligna más común y la primera causa de muerte por cáncer en ambos sexos. Los factores de riesgo más comunes para el CG son la edad mayor, factores dietéticos, infección por *Helicobacter pylori*, el consumo de tabaco, la radiación y la historia familiar; por lo cual, en países en desarrollo como el nuestro, sigue teniendo bastante impacto. Además, los síntomas del CG tienden a aparecer tarde, por lo que el diagnóstico tradicional suele darse mayormente en etapas avanzadas.

Usted está siendo invitado a participar de esta investigación que tiene como objetivo evaluar el nivel de expresión relativa del microARN circulante miR-21 como biomarcador asociado al cáncer gástrico en la zona norte del Perú. Para realizarlo, requerimos recolectar datos de su historia clínica, así como obtener una muestra de sangre. En la muestra de sangre se estudiarán y analizarán características de estas moléculas, las cuales pueden ser utilizadas para aumentar la especificidad de las pruebas de diagnóstico no invasivas del CG. Toda información personal y clínica brindada será resguardada y los resultados verídicos obtenidos serán publicados respetando la confidencialidad. Esta investigación podría aportar herramientas útiles para mejorar la eficiencia del diagnóstico de esta enfermedad, beneficiando a muchas personas y favoreciendo el establecimiento de una terapia temprana que mejore la calidad y expectativa de vida de los pacientes con CG. Así, si usted decide participar del estudio firme el Término de Consentimiento abajo, después de leerlo detenidamente y después de aclarar todas sus dudas sobre este asunto.

CONSENTIMIENTO:

Después de leer, entender y no teniendo ninguna duda sobre la Información que el investigador me ha proporcionado, doy mi consentimiento para participar en el estudio.

Nombre del paciente:

Firma:

Fecha: ____/____/____

ANEXO 4: PRUEBA PARA ESTANDARIZACIÓN DE SEPARACIÓN DE PLASMA A PARTIR DE SANGRE HUMANA ENDOVENOSA

A) Protocolo:

1. Colectar muestras de sangre en 9 tubos Vacutainer con EDTAK2 a partir de 6 voluntarios sanos.
2. Invertir los tubos 10 veces aproximadamente y conservar a 4°C.
3. Separar por centrifugación el plasma de los restos celulares (4°C) a partir de cada tubo empleando diversos parámetros:
 - a) 1000g x 10 min (Page et al., 2013)
 - b) 1200g x 10 min (velocidad propuesta)
 - c) 1440g x 10min (Qiagen Sample & Assay Technologies, 2012)
4. Visualizar y determinar el grado de hemólisis según una puntuación del 0 al 3.

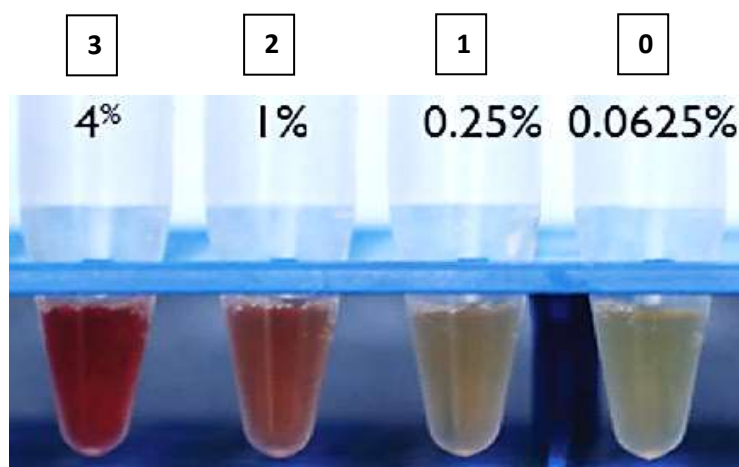


Imagen 1: Una serie de hemólisis que fue preparada a partir de una muestra 100% hemolizada con suero no hemolizado (Shah et al., 2016)

5. Cuantificar concentración de oxi-hemoglobina empleando método instalado en el NanoDrop One.

ANEXO 5: PROTOCOLO DEL *TOTAL EXOSOME ISOLATION (FROM PLASMA) KIT*

(INVITROGEN)

A) PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

1. Retira la muestra de plasma del almacenamiento y colócala en hielo. Si la muestra está congelada, descongélala en un baño de agua de 25 ° C a 37 ° C hasta que esté completamente líquida y colócala en hielo hasta que se necesite.
2. Centrifuga la muestra de plasma a 2000 × g durante 20 minutos a temperatura ambiente para eliminar las células y los desechos.
3. Transfiere el sobrenadante que contiene el plasma parcialmente clarificado a un nuevo tubo sin alterar el pellet.
4. Centrifuga el nuevo tubo a 10.000 × g durante 20 minutos a temperatura ambiente para eliminar los residuos.
5. Transfiere el sobrenadante que contiene el plasma clarificado a un nuevo tubo sin alterar el pellet y colócalo en hielo hasta que esté listo para realizar el aislamiento.
6. Continúa el aislamiento de exosomas con el **“tratamiento con proteinasa”** o **“sin tratamiento con proteinasa”**.

B) AISLAMIENTO DE EXOSOMAS CON TRATAMIENTO DE PROTEINASA

1. Transfiere el volumen requerido de plasma clarificado a un nuevo tubo y añade 0,5 volúmenes de **PBS 1X**.
2. Mezcla bien (completamente) la muestra mediante un vórtex.
3. Añade 0,05 volúmenes de **Proteinasa K** a la muestra. Por ejemplo, para 100 µL de volumen inicial de plasma, añade 5 µL de Proteinasa K.
4. Agita la muestra usando el vórtex y luego incuba el tubo a 37°C durante 10 minutos.
5. Añade 0,2 volúmenes (es decir, volumen total = plasma + PBS) del **Reactivo de Precipitación de Exosomas** (para plasma) a la muestra.

Plasma + PBS	Reagent
100 µL + 50 µL	30 µL
1 mL + 0.5 mL	300 µL

6. Mezcla bien la mezcla de *plasma tratado con proteinasa K/reactivo*, ya sea mediante vórtex o inversión hasta que la solución sea homogénea.
Nota: La solución debe tener un aspecto turbio.
7. Incuba la muestra entre 2°C y 8°C durante 30 minutos.

- Después de la incubación, centrifuga la muestra a $10.000 \times g$ durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Nota: Para el plasma de ratón, centrifugar durante 30 minutos a $4^{\circ}C$.

- Aspira el sobrenadante con una pipeta y deséchalo. Los exosomas están contenidos en un pellet en el fondo del tubo.
- (Opcional)* Centrifuga el tubo durante 30 segundos a $10.000 \times g$ para recoger cualquier reactivo residual.
- Descarta cualquier sobrenadante residual mediante una cuidadosa aspiración con una pipeta y proceder a "**Resuspender los exosomas**".

C) RESUSPENSIÓN DE EXOSOMAS:

- Añade **PBS 1X** o un tampón similar al pellet y agita usando el vórtex o pipetea hacia arriba y hacia abajo para resuspender los exosomas.
- Una vez que se resuspende el pellet, los exosomas están listos para el análisis posterior o una purificación adicional a través de métodos de afinidad.

Starting Plasma Volume	Resuspension Volume
100 μ L	25–50 μ L
1 mL	100–500 μ L

Nota: Mantenga los exosomas aislados entre $2^{\circ}C$ y $8^{\circ}C$ durante un máximo de 1 semana, o a $-20^{\circ}C$ o menos para el almacenamiento a largo plazo.

ANEXO 6: PROTOCOLO MODIFICADO DEL *TOTAL EXOSOME RNA AND PROTEIN ISOLATION KIT*

(INVITROGEN)

A) PREPARACIÓN DE REACTIVOS:

- **Solución Desnaturalizadora 2X**

Agrega 375 μ L de **2-mercaptoetanol** a la *Solución Desnaturalizante 2X*. Mezcla bien. Marca la casilla de la etiqueta para indicar que se ha añadido el 2-mercaptoetanol.

Nota: La Solución Desnaturalizante 2X puede solidificarse entre 2°C y 8°C. Antes de usarla, calienta la solución a 37°C con agitación ocasional durante 5-10 minutos, o hasta que esté completamente en solución. Para evitar que se solidifique, puedes almacenar la Solución Desnaturalizante 2X a temperatura ambiente hasta 1 mes si lo deseas.

- **Solución de lavado de miARN 1**

Añade 21 mL de **etanol 100% grado ACS** a la *Solución de Lavado de miARN 1*. Mezcla bien. Marque la casilla de la etiqueta para indicar que se ha añadido el etanol.

- **Solución de lavado 2/3**

Añade 40 mL de **etanol 100% grado ACS** a la *Solución de Lavado 2/3*. Mezcla bien. Marca la casilla de la etiqueta para indicar que se ha añadido el etanol.

Nota: Puede formarse un precipitado en el frasco de la Solución de Lavado 2/3 al precipitarse el exceso de EDTA fuera de la solución. Simplemente deja estos cristales en la botella cuando retire la Solución de Lavado 2/3 para su uso.

B) PROTOCOLO DE AISLAMIENTO DE ARN EXOSOMAL TOTAL

- i. **CONCENTRACIÓN DE EXOSOMAS Y RESUSPENSIÓN DE PELLETT**

Después de sedimentar los exosomas por precipitación (usando el reactivo de aislamiento total de exosomas), ultracentrifugación u otro procedimiento, resuspenda el sedimento de exosomas de acuerdo con las siguientes instrucciones:

1. Resuspende el pellet de exosomas con el **Buffer de Resuspensión de Exosomas** o el **PBS 1X** enfriado con hielo.
2. Incuba la muestra durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente para permitir que el pellet se disuelva.
3. Pipetea suavemente hacia arriba y hacia abajo para resuspender completamente la muestra.
4. Procede inmediatamente al aislamiento del ARN.

Importante:

Si no vas a aislar el ARN inmediatamente después de resuspender la muestra en el Buffer de Resuspensión de Exosomas, guárdalo a -20°C hasta que lo necesites.

ii. AISLAMIENTO DE ARN - EXTRACCIÓN ORGÁNICA:

1. Agrega **1X PBS** a la muestra de exosoma en un tubo sin ARNasa para que el volumen total sea 200 μL .
2. Agrega un volumen de **Solución desnaturalizante 2X** y mezcla bien (completamente).

Importante: Precalienta la Solución desnaturalizante 2X a 37°C para disolver el precipitado si es necesario.

3. Incuba la mezcla sobre hielo durante 5 minutos.
 4. Agrega un volumen de **Ácido-Fenol : Cloroformo** a cada muestra.
- El volumen de Ácido-Fenol : Cloroformo debe ser igual al volumen total de la muestra más la Solución Desnaturalizante 2X (p. ej., Si el volumen de lisado de la muestra inicial fue de 200 μL y se mezcló con 200 μL de Solución Desnaturalizante 2X en el paso 1, adiciona 400 μL de Ácido-Fenol : Cloroformo).

Importante: Asegúrate de retirar la fase inferior que contiene Ácido-Fenol: Cloroformo, no el buffer acuoso que se encuentra en la parte superior de la mezcla.

5. Mezcla las muestras agitando en vórtex durante 30 a 60 segundos.
6. Centrifuga durante 10 minutos a velocidad máxima (16.000 x g) a temperatura ambiente para separar la mezcla en fases acuosa y orgánica. Repite la centrifugación si la interfase no es compacta.
7. Retira con cuidado la fase acuosa (superior) sin alterar la fase inferior o la interfase, y transfírela a un tubo nuevo. Ten en cuenta el volumen recuperado.
8. Procede con la **Purificación y enriquecimiento de ARNs pequeños**

iii. PURIFICACIÓN Y ENRIQUECIMIENTO DE ARNS PEQUEÑOS

Antes de comenzar, asegúrate de:

- Precalentar la **solución de elución** o el **agua libre de nucleasas** a 95°C para usarla en la elución del ARN del filtro al final del procedimiento.
- El **etanol al 100%** debe estar a temperatura ambiente. Si el etanol al 100 % se almacena en frío, caliéntelo a temperatura ambiente antes de iniciar el aislamiento de ARN.

Unión de los ARNs grandes

1. Agrega 1/3 de volumen de **etanol al 100 %** a la fase acuosa y mezcla bien (p. ej., si se recuperan 300 μL , agrega 100 μL de etanol al 100 %).
2. Para cada muestra, coloca un filtro en un tubo de recolección (suministrado en el kit).
3. Agrega hasta 700 μL de la mezcla de lisado/etanol en el filtro a la vez. Para volúmenes $>700 \mu\text{L}$, agrega cualquier muestra restante al mismo filtro en pasos sucesivos.
4. Centrifuga a 12.000 x g durante 1 minuto o hasta que la mezcla haya pasado por el filtro.
5. Colecta el flujo (que contiene el ARN pequeño). Si el volumen de la muestra fue $>700 \mu\text{L}$, transfiere el flujo a un tubo nuevo y repite los pasos 3 a 5 hasta que toda la muestra haya pasado por el filtro. Reúne el caudal recogido para muestras $>700 \mu\text{L}$ y mide el volumen total.

Nota: En este punto, el filtro contiene una fracción de ARN sin ARN pequeño, mientras que el flujo colectado contiene el ARN pequeño.

Unión de los pequeños ARNs

6. Agrega 2/3 volúmenes de **etanol al 100 %** al flujo que contiene el ARN pequeño y mezcla bien (p. ej., si se recuperan 400 μL del flujo, agrega 266 μL de etanol al 100 %).
7. Coloca un filtro nuevo en un tubo de recolección (suministrado en el kit).
8. Agrega hasta 700 μL de la mezcla de flujo/etanol que contiene el ARN pequeño en el segundo filtro a la vez. Para volúmenes $>700 \mu\text{L}$, agrega cualquier muestra restante al mismo filtro en pasos sucesivos.
9. Centrifuga a 12.000 x g durante 1 minuto o hasta que la mezcla haya pasado por el filtro y desecha el líquido sobrante.
10. Si el volumen de la muestra fue $>700 \mu\text{L}$, repite los pasos 8 y 9 hasta que toda la muestra haya pasado por el filtro. Reutiliza el tubo de recolección para los pasos de lavado.

Lavado de los ARNs pequeños

11. Agrega 700 μL de **solución de lavado 1 de miARN** (que contiene etanol) al filtro.
12. Centrifuga a 12.000 x g durante 1 minuto. Desecha el flujo del tubo de recolección y vuelve a colocar el filtro en el mismo tubo de recolección.
13. Agrega 500 μL de **solución de lavado 2/3** (que contiene etanol).
14. Centrifuga a 12.000 x g durante 1 minuto. Desecha el flujo del tubo de recolección y vuelve a colocar el filtro en el mismo tubo de recolección.
15. Repite los pasos 13 y 14 una vez.
16. Después de desechar el líquido sobrante del lavado final, vuelve a colocar el filtro en el mismo tubo de recolección y centrifuga el conjunto a 16.000 x g durante 1-3 minutos para eliminar el líquido residual del filtro.

Elución de los ARNs pequeños

17. Transfiere el filtro a un tubo de recolección nuevo (suministrado en el kit).
18. Agrega 30 μL de **solución de elución** o agua libre de nucleasas precalentada (95 °C) al centro del filtro.
19. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
20. Centrifuga durante 1 minuto para recuperar el ARN.
21. Agrega 30 μL de **solución de elución** o agua libre de nucleasas precalentada (95 °C) al centro del filtro.
22. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
23. Centrifuga durante 1 minuto para recuperar el ARN.
24. Colecta lo eluido (que contiene el ARN) y guárdalo a ≤ -20 °C.

ANEXO 7: PROTOCOLO DEL miRNA 1st-strand cDNA SYNTHESIS KIT

(AGILENT TECHNOLOGIES)

❖ Detalles importantes:

1. **Cantidad de ARN para usar como plantilla:** El kit puede adaptarse en un rango de entrada total de ARN entre 30ng y 1µg. La cantidad óptima del ARN plantilla depende de la pureza del ARN y el nivel de expresión del miRNA particular de interés.
2. **Mezcla y pipeteo de enzimas:** Las enzimas (p. ej. poli A polimerasa) deben mezclarse suavemente sin generar burbujas. Pipetee las enzimas con cuidado y lentamente; de lo contrario, la viscosidad del 50 % de glicerol en el tampón puede provocar errores de pipeteo.

A) PROCESO DE POLIADENILACIÓN

1. Preparar las reacciones de poliadenilación añadiendo los siguientes componentes en un tubo de microcentrífuga libre de ARNasas:
 - Agua libre de ARNasa para llevar el volumen final a 20 µl (incluida la polimerasa añadida en el paso 2)
 - 4.0 µl de 5× poly A polymerase Buffer
 - 1.0 µl de rATP (10 mM)
 - 1.0 µl de 25 mM MnCl₂ (opcional)
 - µl de ARN total (30 ng – 1 µg)

Nota: Incluir MnCl₂ en la reacción puede mejorar la eficiencia de la enzima PAP. Si se incluye MnCl₂, el ARN poliadenilado deberá purificarse con extracción de fenol-cloroformo y precipitación con etanol antes de la síntesis de ADNc.
2. Añadir 1 µl de E. coli poli A polimerasa a cada reacción y mezcle suavemente (no agite). Centrifugar brevemente las reacciones para recoger el contenido en el fondo de los tubos.
3. Incubar las reacciones a 37°C por 30 minutos.
4. Incubar las reacciones a 95°C por 30 minutos para terminar la adenilación, luego inmediatamente transferir a tubos con hielo.
5. Continúe con la purificación de ARN (si se incluyó MnCl₂) o la síntesis de ADNc de la primera cadena (si se omitió MnCl₂), o guarde las reacciones a –20 °C. Para el almacenamiento a largo plazo, almacene las reacciones a –80°C.

B) SÍNTESIS DE 1st-strand DE ADNc

1. Por cada muestra de ARN, prepara una reacción de síntesis de ADNc agregando los siguientes componentes en un tubo de microcentrífuga libre de ARNasas:
 - Agua libre de ARNasa para llevar el volumen final a 20 μ l.
 - 2.0 μ l de 10 \times AffinityScript RT Buffer
 - 10 μ l de ARN poliadenilado y purificado o
4 μ l de ARN únicamente poliadenilado.
 - 0.8 μ l de dNTP mix (100 mM)
 - 1.0 μ l de primer adaptador RT (10 μ M)
 - 1.0 μ l de Mezcla de Enzimas AffinityScript RT/RNase Block.
2. Mezclar suavemente las reacciones (no usar vortex) y centrifugar brevemente los tubos.
3. Incubar las reacciones a 55°C por 5 minutos.
4. Transferir las reacciones a 25°C e incubar por 15 minutos.
5. Transferir las reacciones a 42°C e incubar por 30 minutos para permitir la transcripción reversa de la 1st-strand de ADNc.
6. Incubar las reacciones a 95°C por 5 minutos para terminar la transcripción reversa.
7. Añadir hasta 280 μ l de Agua libre de ARNasa a cada reacción.
8. Coloque las reacciones de síntesis de la 1st-strand de ADNc completadas en hielo para su uso inmediato en qPCR. Para el almacenamiento a largo plazo, mantenga las reacciones a -20°C.

ANEXO 8: RESULTADOS DE VALORES DE CT Y CURVA DE MELTING OBTENIDOS MEDIANTE RT-qPCR

Grupo	Muestras	Valores de Ct y T°M de los productos de miR-21								
		Replica 1			Replica 2			Replica 3		
		Valores Ct	T° M 1	T° M 2	Valores Ct	T° M 1	T° M 2	Valores Ct	T° M 1	T° M 2
Individuos sanos (IS)	IS1	28.855	78.105	-	28.513	77.858	-			
	IS2	30.933	78.103	-	30.632	78.107	57.986	30.529	78.555	-
	IS3	30.685	78.351	-	30.748	78.106	57.984	30.27	78.555	-
	IS4	31.062	77.856	-	31.262	77.857	-	31.168	78.553	-
	IS5	29.628	78.105	-	29.677	77.858	-			
	IS6	30.395	78.105	-	29.85	78.104	-			
Pacientes con CG (PC)	PC2	30.646	78.601	-	30.586	78.798	-			
	PC7	29.455	78.6		31.957	78.6	-			
	PC8	28.832	77.856	-	29.006	78.104	-			
	PC9	26.732	78.352	59.721	27.039	78.106	-			
	PC10	29.679	78.104	-	30.779	78.106	-			

Grupo	Muestras	Valores de Ct y T°M de los productos de miR-16								
		Replica 1			Replica 2			Replica 3		
		Valores Ct	T° M 1	T° M 2	Valores Ct	T° M 1	T° M 2	Valores Ct	T° M 1	T° M 2
Individuos sanos (IS)	IS1	28.602	78.354	-	28.681	78.106	-			
	IS2	30.014	78.106	-	30.31	78.106	-	29.345	78.355	-
	IS3	29.208	78.355	-	29.576	78.603	-	28.352	78.603	-
	IS4	30.125	78.353	-	29.821	78.354	-	29.083	78.106	-
	IS5	28.679	78.105	-	28.931	77.858	-			
	IS6	30.344	77.856	-	30.209	78.104	-			
Pacientes con CG (PC)	PC2	31.106	78.354	-	31.337	78.6	-			
	PC7	33.445	80.09	-	33.628	80.09	58.482			
	PC8	29.278	77.856	-	29.171	77.856	-			
	PC9	29.927	79.843	-	30.58	79.596	-			
	PC10	32.954	80.091	-	34.871	80.093	59.725			

ANEXO 9: TABLA DEL PROCESAMIENTO DE DATOS PARA DETERMINAR LOS NIVELES DE EXPRESIÓN RELATIVA DE miR-21 EXOSOMAL PLASMÁTICO

		INTERÉS	REFERENCIA	Procesamiento de Datos (Método de Livak)		
		miR-21	miR-16			
Grupo	Muestras	\bar{X} valores Ct	\bar{X} valores Ct	ΔCt (Ct miR-21 - Ct miR-16)	$\Delta\Delta Ct$ (dCt Referencia o Interés - dCt Prom. Referencia)	Fold Change = $2^{-\Delta\Delta Ct}$
Individuos sanos (IS)	IS1	28.684	28.6415	0.0425	-0.716555556	1.643254067
	IS2	30.698	29.88966667	0.808333333	0.049277778	0.966420004
	IS3	30.56766667	29.04533333	1.522333333	0.763277778	0.589156256
	IS4	31.164	29.67633333	1.487666667	0.728611111	0.603484612
	IS5	29.6525	28.805	0.8475	0.088444444	0.940536316
	IS6	30.1225	30.2765	-0.154	-0.913055556	1.88302944
\bar{X} ΔCt del Grupo Control (IS)				0.759055556	\bar{X} Fold Change	1.104313449
Pacientes con CG (PC)	PC2	30.616	31.2215	-0.6055	-1.364555556	2.574969878
	PC7	30.706	33.5365	-2.8305	-3.589555556	12.03826483
	PC8	28.919	29.2245	-0.3055	-1.064555556	2.091525454
	PC9	26.8855	30.2535	-3.368	-4.127055556	17.47300157
	PC10	30.229	33.9125	-3.6835	-4.442555556	21.74415222
					\bar{X} Fold Change	11.18438279

ANEXO 10: MIGRACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PRODUCTOS DE RT-qPCR

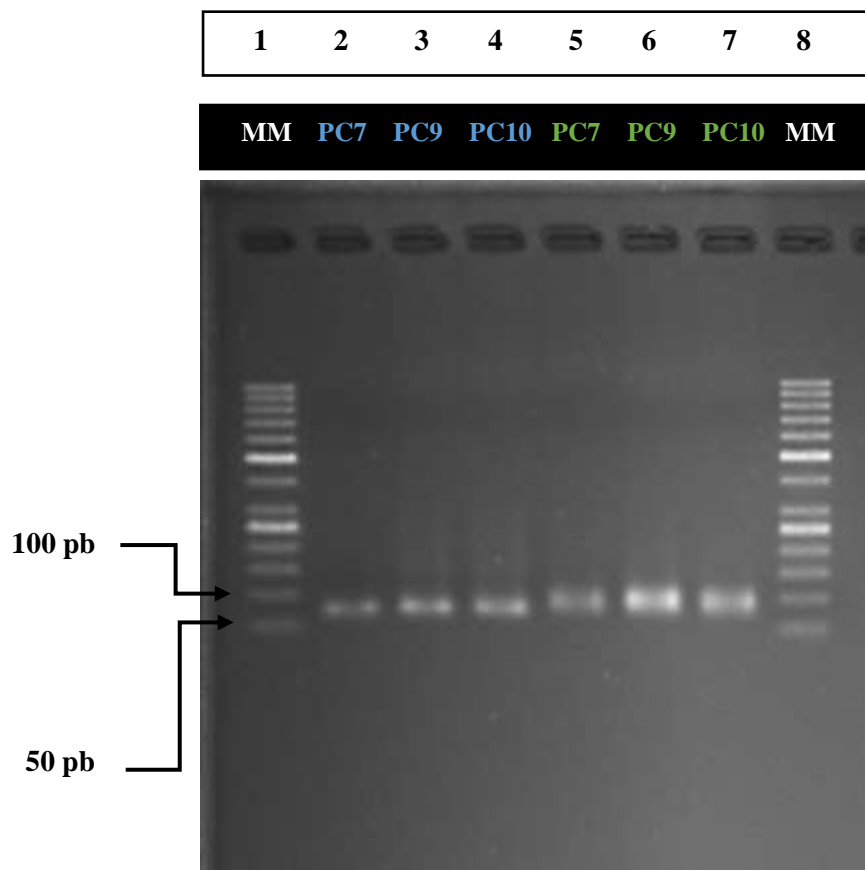


Imagen 2: Resultado de migración electroforética de productos de RT-qPCR de miR-21 y miR-16 de muestras de pacientes con cáncer gástrico, los carriles del 2 al 4 son productos de miR-21 y del 5 al 7, productos de miR-16. Se observa peso molecular de productos de miR-21 mayor a 50pb y menor a 100pb (probablemente en 75pb), mientras que los productos de miR-16 son de aproximadamente 100pb (MM: marcador de peso molecular).

ANEXO 11: REGISTRO FOTOGRÁFICO

- Instituto Regional de Enfermedades Neoplásicas “Dr. Luis Pinillos Ganoza” IREN - NORTE



Frontis del IREN-Norte.



Área de consultorios externos del Departamento de Abdomen del IREN-Norte.

- Toma de muestra de sangre intravenosa para separación de plasma



- **Etapa de separación de plasma sanguíneo**



Pesado de tubos vacutainer lila con las muestras de sangre colectadas para la calibración de contrapesos y posterior centrifugación.



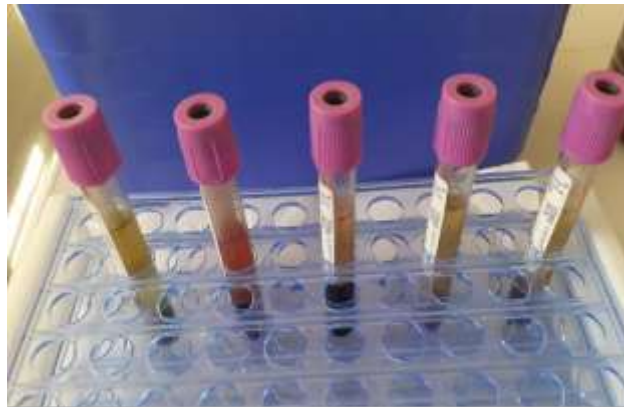
Centrífuga Refrigerada de rotor oscilante modelo Digicen 21 R (OrtoAlresa- Daganzo de Arriba, Madrid, España) del Laboratorio de Bioprocesos del IITA-UNS.



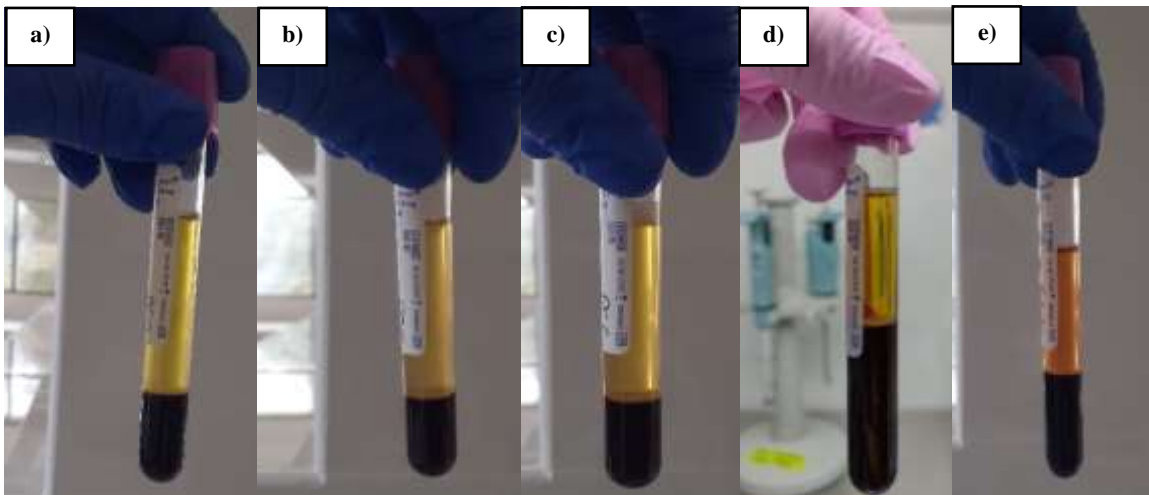
Congeladora de -80°C del Laboratorio de Bioprocesos del IITA-UNS.



Centrifugación de muestras de sangre a 1440 x g por 10 min a 4°C, para separación de plasma sanguíneo



Plasma sanguíneo separado luego de la centrifugación refrigerada.



Tipos de apariencias de plasma obtenido: a) amarillo claro, b) amarillo opaco, c) amarillo fuerte opaco, d) amarillo anaranjado y e) rojizo



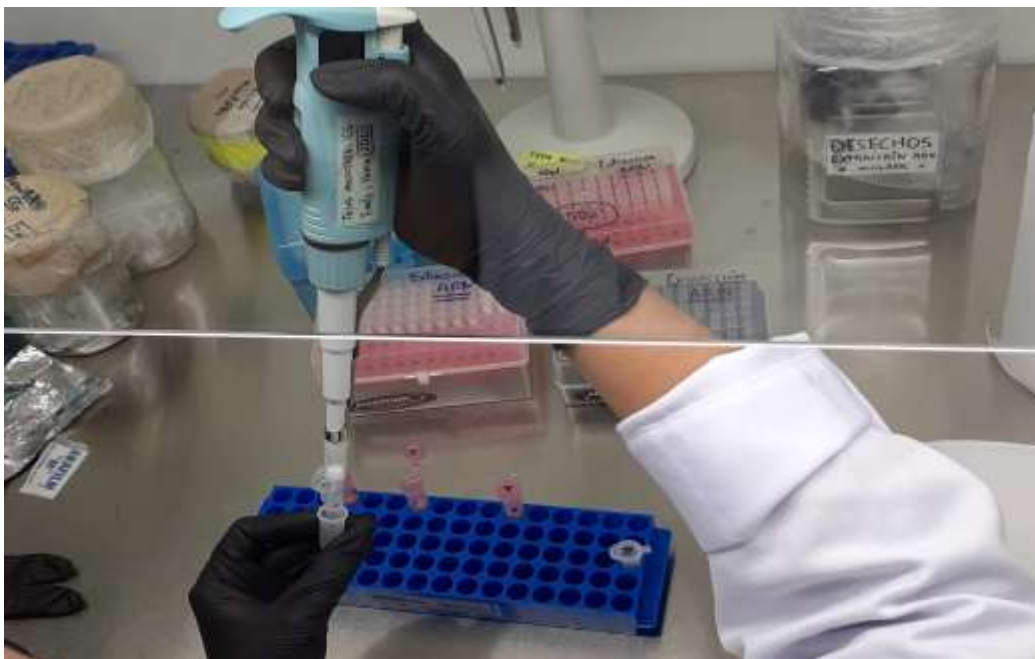
Recuperación por duplicado de cada muestra de plasma separado, en tubos eppendorf estériles libres de nucleasas de 1.5 mL para extracción de microARNs exosomales.



Plasma sanguíneo recuperado para almacenamiento y conservación a -80°C , hasta su próximo procesamiento.



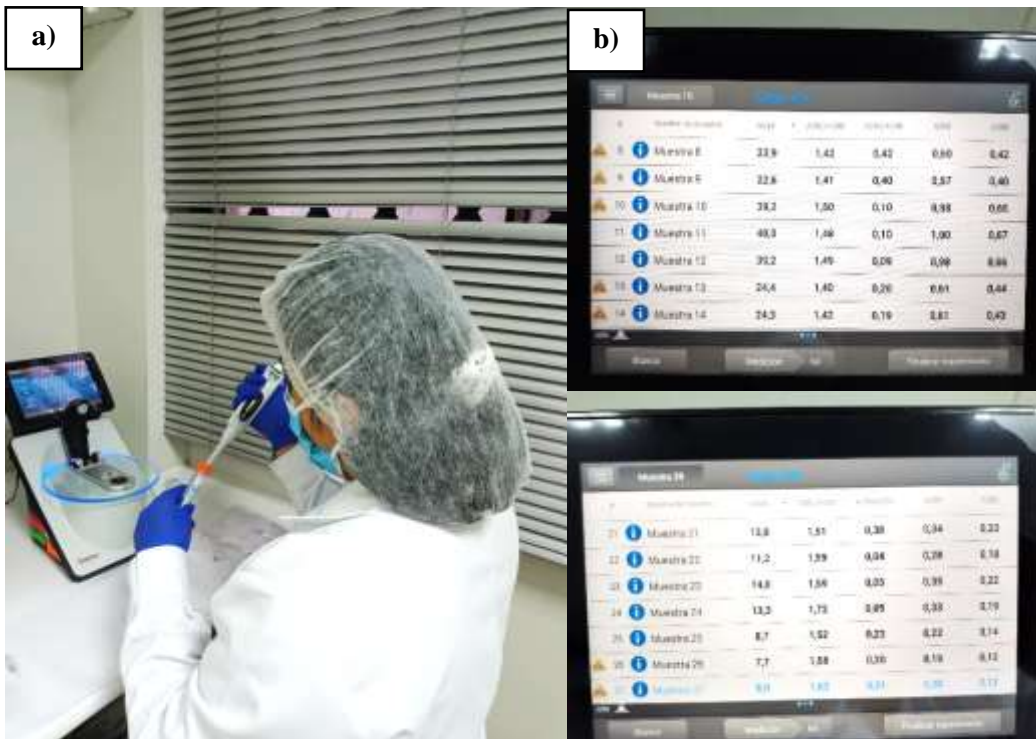
Proceso de extracción tanto de exosomas a partir de plasma sanguíneo para posterior extracción de ARNs pequeños exosomales totales.



Continuación del proceso de extracción de ARNs pequeños exosomales totales a partir de exosomas plasmáticos.



Alicuotado de ARNs pequeños exosomales totales obtenidos para su conservación a -80°C , cuantificación y preparación de síntesis de ADNc.

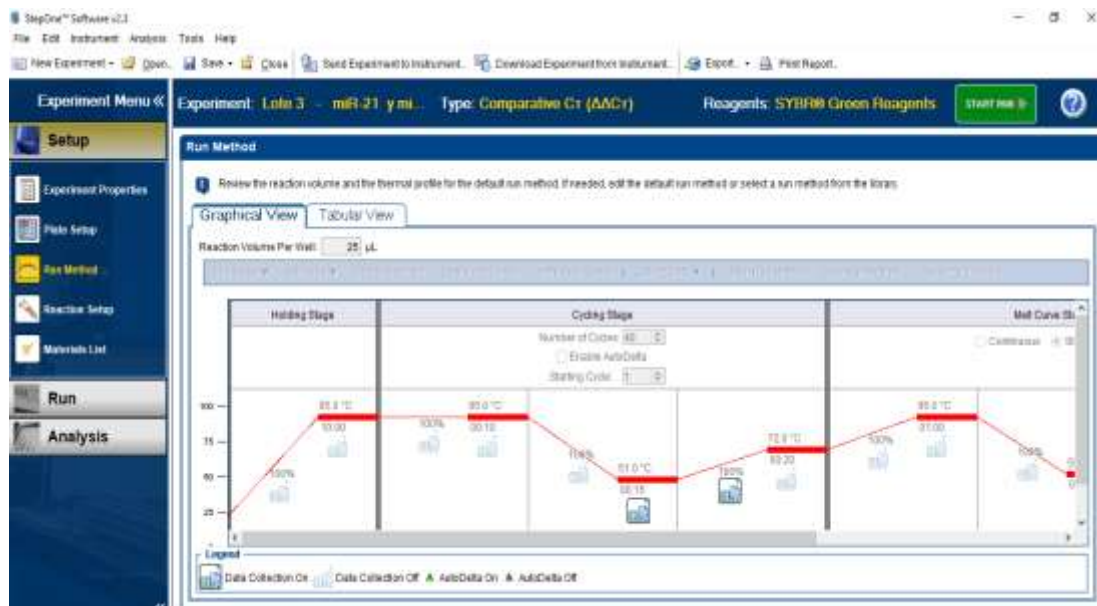


a) Cuantificación de ARNs pequeños exosomales totales en el equipo NanoDrop One del Laboratorio de Ingeniería Genética y Genómica de la UNS y b) Algunos valores obtenidos de la cuantificación de nuestras.

- Etapa de RT-qPCR y análisis posteriores



Muestras de ADNc obtenidas de la síntesis por Transcripción Reversa de los ARNs pequeños exosomales totales extraídos del plasma sanguíneo de pacientes con cáncer gástrico y de los Individuos Sanos (preparación de alícuotas y conservación de las muestras a -80°C).



Configuración del programa de PCR en tiempo real para la amplificación de miR-21 y miR-16 en el equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System, del Laboratorio de Laboratorio de Genética, Fisiología y Reproducción de la UNS.



Vista de resultados de amplificación de miR-21 y miR-16 de un grupo de muestras procesadas.



Preparación de migración electroforética para validación de especificidad de productos de amplificación de miR-21 y miR-16.



Visualización de resultados de migración electroforética en el Fotodocumentador.



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Emely Melissa Gonzales Gomez Y Vania Marisa Cedron Mag...
Título del ejercicio: "EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL NIVEL DE EXPRESIÓN RELATIV...
Título de la entrega: "EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL NIVEL DE EXPRESIÓN RELATIV...
Nombre del archivo: INFORME_DE_TESIS_UN_-para_turnitin_-FINAL.pdf
Tamaño del archivo: 696.16K
Total páginas: 68
Total de palabras: 20,329
Total de caracteres: 105,012
Fecha de entrega: 23-may.-2023 04:43p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega... 2100359677

**"EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL NIVEL DE EXPRESIÓN
RELATIVA DEL microARN EXOSOMAL miR-21 A PARTIR DE
PLASMA SANGUÍNEO COMO POTENCIAL BIOMARCADOR
DEL CÁNCER GÁSTRICO"**

RESUMEN

El cáncer gástrico (CG) es una enfermedad neoplásica considerada la primera causa de muerte por cáncer en mujeres y hombres en el Perú. Uno de los enfoques actuales para reducir esta tasa de mortalidad es el desarrollo de nuevas metodologías de diagnóstico, ya que las tradicionales son invasivas y brindan diagnósticos tardíos. Se conoce que la aparición y progresión del CG así como de otras neoplasias puede deberse a cambios en el perfil de microARNs, los cuales participan en la regulación pos-transcripcional de la expresión génica. Algunos de ellos han sido propuestos con una alta expectativa para ser nuevos biomarcadores de pronóstico, diagnóstico e inclusive blancos terapéuticos del CG. Diferentes investigaciones han determinado que el microARN miR-21 puede ser transportado mediante exosomas en diversos fluidos corporales de forma circulante, relacionándolo además con algunos tipos de cáncer; sin embargo, su relación con el CG ha sido poco estudiado, además, no se han reportado estudios que analicen los niveles de expresión de miR-21 exosomal en plasma sanguíneo.

En la presente investigación evaluamos de forma preliminar el nivel de expresión relativa del miR-21 exosomal plasmático como potencial biomarcador no invasivo asociado al CG. Para ello se estandarizó y optimizó el protocolo de extracción de microARNs exosomales obteniéndose concentraciones de ARNs pequeños exosomales totales mayores de 14.6 ng/ul., así como el protocolo de amplificación de microARNs mediante la técnica Transcripción Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real Cuantitativa (RT-qPCR) en el cual se obtuvieron valores de Ct en congruencia con la abundancia reportada de los microARNs miR-21 y miR-16 (control endógeno). Posteriormente, se determinó el nivel de expresión relativa promedio del miR-21 exosomal plasmático en pacientes con CG (PC), los resultados mostraron una sobreexpresión significativa en PC en comparación con los individuos sanos (IS) (PC vs. IS, 11.184 vs. 1.104, $P = 0.0043$).

Finalmente, teniendo en cuenta la naturaleza preliminar del estudio, se reporta el primer hallazgo del microARN miR-21 exosomal en plasma como posible biomarcador no invasivo para la detección del CG, además de métodos estandarizados para su replicación en nuevos estudios, lo que abre la oportunidad de desarrollar e implementar una herramienta no invasiva para el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades recurrentes en nuestro país con la finalidad de reducir la mortalidad que tanto el CG y otras enfermedades ocasionan.

"EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL NIVEL DE EXPRESIÓN RELATIVA DEL microARN EXOSOMAL miR-21 A PARTIR DE PLASMA SANGUÍNEO COMO POTENCIAL BIOMARCADOR DEL CÁNCER GÁSTRICO"

INFORME DE ORIGINALIDAD

5%

INDICE DE SIMILITUD

5%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	www.lajar.cl Fuente de Internet	<1 %
2	Submitted to Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales (FLACSO) - Sede Ecuador Trabajo del estudiante	<1 %
3	www.um.es Fuente de Internet	<1 %
4	www2.inecc.gob.mx Fuente de Internet	<1 %
5	González Pérez Miriam Masiel. "Desarrollo metodológico para la caracterización molecular de bacterias ácido-lácticas de interés en alimentos aisladas del tracto intestinal de ratón", TESIUNAM, 2019 Publicación	<1 %
6	dspace.unl.edu.ec Fuente de Internet	<1 %

7	www.salud.gob.sv Fuente de Internet	<1 %
8	Submitted to Universitat Politècnica de València Trabajo del estudiante	<1 %
9	pt.scribd.com Fuente de Internet	<1 %
10	seom.org Fuente de Internet	<1 %
11	repositorioinstitucional.buap.mx Fuente de Internet	<1 %
12	ixtlan.izt.uam.mx Fuente de Internet	<1 %
13	transparencia.unitru.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
14	www.nccn.org Fuente de Internet	<1 %
15	www.google.co.ls Fuente de Internet	<1 %
16	www.symptoma.es Fuente de Internet	<1 %
17	Submitted to Universidad San Francisco de Quito Trabajo del estudiante	<1 %

18

www.sipromicro.com

Fuente de Internet

<1 %

19

Hernández Pedro Norma Yanet. "All-trans ácido retinoico en procesos de inhibición de proliferación celular, inducción de apoptosis y expresión de los receptores RAR y RXR, en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas tratadas con quimioterapia", TESIUNAM, 2019

Publicación

<1 %

20

repositorio.uns.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

21

García Berrocoso, Teresa, Garcia-Dorado, David et al. "Identificación y uso de biomarcadores pronósticos en el ictus isquémico", [Barcelona] : Universitat Autònoma de Barcelona,, 2014

Fuente de Internet

<1 %

22

Navarro Mabarak Cynthia María. "Papel de NF-kB en la regulación de los citocromos P450 epoxigenasas durante un proceso inflamatorio desarrollado en astrocitos", TESIUNAM, 2019

Publicación

<1 %

23

cncr-gstrico.blogspot.com

Fuente de Internet

<1 %

stutzartists.org

24

Fuente de Internet

<1 %

25

Submitted to Universidad de Jaén

Trabajo del estudiante

<1 %

26

www.mdpi.com

Fuente de Internet

<1 %

27

Rodríguez Gómez Gabriel Miguel.
"Caracterización del complejo tristetraprolina
- receptor de estrógenos alfa como supresor
de tumores en células de cáncer mamario",
TESIUNAM, 2022

Publicación

<1 %

28

Submitted to Universidad Autónoma de
Nuevo León

Trabajo del estudiante

<1 %

29

www.tdx.cat

Fuente de Internet

<1 %

30

Carmen I Villagran-Blanco. "Biomarcadores
suPAR y citocinas en la detección temprana
de cáncer gástrico", Ciencia, Tecnología y
Salud, 2020

Publicación

<1 %

31

roderic.uv.es

Fuente de Internet

<1 %

32

García Rayo Alondra Guadalupe. "Estudio de
caso aplicado a una persona adulto mayor,

<1 %

por tratamiento con cirugía de resección interesfintérica laparoscópica + colon anastomosis + ileostomía de protección por cáncer de recto, valorada con la filosofía conceptual de Virginia Henderson", TESIUNAM, 2019

Publicación

33

Navarro Delgado Erick Isaac. "Identificación de genes codificantes y elementos repetidos regulados por DAXX mediante RNA-SEQ", TESIUNAM, 2021

Publicación

<1 %

34

Velasco López Mitzli Xochitl. "Antagonismo entre la proteína de unión a RNA Musashi1 y miR-137, y su impacto en la neurogénesis y el desarrollo de glioblastoma", TESIUNAM, 2020

Publicación

<1 %

35

espace.curtin.edu.au

Fuente de Internet

<1 %

36

Deivendran Rengaraj, Bo Ram Lee, Sang In Lee, Hee Won Seo, Jae Yong Han. "Expression Patterns and miRNA Regulation of DNA Methyltransferases in Chicken Primordial Germ Cells", PLoS ONE, 2011

Publicación

<1 %

37

Mejía Terrazas Gabriel Enrique. "Asociación de polimorfismos en los genes TRPV1, DRD2, OPRM1, OPRK1, OPRD1, GCH1 y CACNG2 con

<1 %

dolor neuropático en población mexicana", TESIUNAM, 2022

Publicación

38

repositorio.ug.edu.ec

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía

Apagado