



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

EpiDisease S.L.

Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

“Potencial uso de la tecnología basada en microARNs para el diagnóstico y pronóstico de la Escoliosis Idiopática del Adolescente”

Tesis Doctoral presentada por

Ester Berenguer Pascual

Tesis dirigida por:

Dra. Gisselle Pérez Machado

Dr. Jose Luis García Giménez

Dr. Salvador Mena Mollá

Paterna, Octubre 2021

Esta tesis doctoral se ha realizado con la siguiente financiación:

- Ayuda para la formación de Doctores en Empresas “Doctorado Industriales” Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (MINECO). DI-16-08917. Años 2017-2021.

- PLAN DE NEGOCIO EPIDISEASE. NEOTEC EXP – 00112698.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, dar las gracias a mis directores de tesis Gisselle, Jose Luis y Salva por su ayuda e implicación en el trabajo, sin los cuales esta tesis no se hubiese realizado. A Gisselle por su dedicación y empatía y por acompañarme siempre. A Jose Luis y Salva darles las gracias por haberme ofrecido esta oportunidad y por sus ganas incansables de trabajar y de que las cosas salgan bien.

A todas aquellas personas que han participado en este trabajo: a la Dra. Teresa Bas y su equipo de la Unidad de Raquis, así como al *data manager* Miquel, por su implicación y dedicación en el trabajo. Al personal de Biobanco CIBERER, Carmen y Salva, por su predisposición y su impecable labor.

Por supuesto a mis compañeros de trabajo Germán, María José, Santi y Sara. Personas con las que he compartido risas y muy buenos momentos. Personas favorables que siempre me han ayudado cuando lo he necesitado. También a Trini, por ser además de ello, la primera persona con quien comparto el amor gatuno. Y a Eva, por sus sabios consejos y por compartir experiencias que nunca olvidaré.

A mis compañeros de desconexión vespertina en Benimaclet, César, Núria, Alba, Arantxa, Ana Reula y Laura. Amigos que han hecho que este camino sea más llevadero, a todos ellos ¡mil gracias!

Gracias, muchas gracias, a mis padres, Luis y Reyes, y a mi hermana Carmen, que siempre han sido y serán mi punto de apoyo y han contribuido a que este trabajo haya salido adelante. También a mis abuelos, a los que quiero y recuerdo cada día, y aunque algunos de ellos ya no están, estoy segura de que, desde la distancia, también se sienten orgullosos de mí.

Finalmente, a Josep, por su paciencia, confianza y positividad. Por aconsejarme y hacerme ver las cosas otro modo, y sobre todo por estar ahí durante este largo viaje.

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. Escoliosis Idiopática del Adolescente (EIA).....	18
1.1.1. Conceptos generales.....	18
1.1.2. Epidemiología.....	19
1.1.3. Fisiopatología.....	20
1.1.4. Manejo de la escoliosis idiopática en adolescentes.....	22
1.1.4.1. Cribado diagnóstico.....	22
1.1.4.2. Diagnóstico.....	23
1.1.4.3. Tratamiento ortopédico y quirúrgico.....	26
1.1.5. Bases genéticas propuestas para la EIA.....	26
1.1.6. Epigenética. Mecanismos epigenéticos subyacentes a la EIA.....	36
1.1.6.1. Metilación del ADN en la EIA.....	36
1.1.6.2. ARNs largos no codificantes en la EIA.....	37
1.1.6.3. microARNs en la EIA.....	38
1.1.7. Potencial uso de los biomarcadores epigenéticos en el manejo de la EIA.....	43
1.2. Técnicas de detección de miARNs maduros.....	45
1.2.1. Tecnologías de alto rendimiento.....	45
1.2.1.1. Microarrays.....	45
1.2.1.2. Secuenciación de última generación; NGS.....	46
1.2.2. Técnicas de amplificación.....	47
1.2.2.1. RT-qPCR.....	47
1.2.2.2. PCR digital en gotas (<i>droplet digital PCR</i> , ddPCR).....	47
1.2.2.3. Otras técnicas de amplificación.....	48
1.2.2.3.a. Métodos basados en RCA (<i>rolling circle amplification</i>).....	48
1.2.2.3.b. Métodos basados en reacción en cadena de la ligasa (<i>ligase chain reaction</i> , LCR).....	49
1.2.2.3.c. Reacción de amplificación isotérmica exponencial (<i>exponential isothermal amplification reaction</i> , EXPAR).....	49
1.2.2.4. Métodos químicos de detección.....	50
1.2.2.4.a. SYBR Green.....	50
1.2.2.4.b. Taqman.....	50
1.2.2.5. Métodos en base al diseño de cebadores para la RT.....	51

1.2.2.5.a. Métodos basados en <i>stem loop</i>	51
1.2.2.5.b. Métodos basados en poliadenilación	52
1.2.2.5.c. Métodos basados en ligamiento	53
1.2.2.6. Estrategias de cuantificación.....	54
1.2.2.6.a. Cuantificación absoluta	54
1.2.2.6.b. Cuantificación relativa.....	54
1.2.2.7. Consideraciones a tener en cuenta en el estudio de miARNs	55
1.2.3. Otras técnicas.....	57
1.3. Desarrollo de producto sanitario de diagnóstico <i>in vitro</i> (<i>In vitro diagnostic, IVD</i>).....	58
2. ANTECEDENTES E HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	66
2.1. Antecedentes e Hipótesis.....	67
2.2. Justificación del proyecto.....	68
2.3. Objetivos	69
2.3.1. Objetivo principal.....	69
2.3.2. Objetivos secundarios	69
2.3.2.1. Científicos y de investigación	69
2.3.2.2. Objetivos industriales.....	69
3. MATERIAL Y MÉTODOS	70
3.1. Material.....	71
3.1.1. miARNs sintéticos.....	71
3.1.2. Cebadores y sondas.....	71
3.1.3. Reactivos comerciales	73
3.1.4. Equipos	74
3.1.5. <i>Software</i>	74
3.2. Métodos	75
3.2.1. Estudio de Hemólisis	75
3.2.1.1. Búsqueda bibliográfica.....	75
3.2.1.2. Estudio de hemólisis controlada <i>in vitro</i>	75
3.2.1.2.a. Preparación de plasma con diferentes grados de hemólisis.....	75
3.2.1.2.b. Evaluación de la hemólisis mediante espectrofotometría.....	76
3.2.1.2.c. Purificación de miARNs del plasma sanguíneo.....	76
3.2.1.2.d. Evaluación de la hemólisis mediante RT-qPCR	77
3.2.2. Preparación de soluciones de oligonucleótidos de ARN: cebador de RT, <i>Forward</i> , <i>Reverse</i> , sonda y oligo mímico de los microARNs.....	79
3.2.2.1. Preparación de curvas de calibrado de oligo mímico de miARNs.....	79
3.2.3. Optimización de la RT-qPCR con la plataforma LightCycler 480II (Roche).....	80

3.2.3.1. Evaluación de la especificidad de cebadores	82
3.2.3.1.a. Evaluación mediante curvas de <i>melting</i>	83
3.2.3.1.b. Evaluación por electroforesis capilar	83
3.2.3.2. Optimización de la qPCR	84
3.2.3.2.a. Optimización de la Ta	84
3.2.3.2.b. Optimización de la concentración de cebadores F y R	86
3.2.3.2.c. Optimización de la concentración de sonda	88
3.2.3.2.d. Validación de qPCR	88
3.2.3.3. Optimización de la concentración de cebador de RT.....	90
3.2.4. Validación de la RT-qPCR en la plataforma LightCycler 480II (Roche).....	91
3.2.4.1. Condiciones de la RT-qPCR en equipo LightCycler 480II (Roche).....	92
3.2.4.2. Procesamiento de datos para el cálculo de los parámetros analíticos.....	92
3.2.4.3. LOC y LOD.....	92
3.2.4.4. Cálculo de LOC en base al <i>threshold</i>	93
3.2.4.5. Variación Intraensayo (repetitividad)	94
3.2.4.6. Variación interensayo (reproducibilidad)	94
3.2.5. Evaluación de la RT-qPCR en equipo QS5 (Thermo Fisher Scientific)	95
3.2.6. Estudio de IsomiRs	95
3.2.7. Evaluación de las cantidades de entrada (<i>input</i>) de ARN y cADN.....	95
3.2.8. Evaluación de la sensibilidad y especificidad del método de RT-qPCR optimizado en la plataforma LightCycler480II (Roche) con muestras de plasma de pacientes	96
3.2.9. Diseño, desarrollo y fabricación del prototipo del kit ScoliPro® basado en la tecnología de RT-qPCR en la plataforma LightCycler 480II (Roche).....	97
3.2.9.1. Estudio con distintos volúmenes y formatos de placa de PCR	97
3.2.9.2. Diseño y fabricación del kit ScoliPro®	98
3.2.10. Redacción de la documentación asociada al ensayo de funcionamiento del kit ScoliPro®	98
3.2.10.1. Diseño del ensayo de funcionamiento clínico en colaboración con la Organización de investigación por contrato Experiior (CRO, <i>Contract research organization</i>) y redacción de la documentación reglamentaria	98
3.2.10.2. Cálculo del tamaño muestral	99
3.2.10.3. Solicitud de aprobación del protocolo por el Comité de Ética de Investigación con Medicamentos (CEIm) del Hospital Universitario y Politécnico La Fe y del CEIm del Hospital Universitario Doctor Peset.....	99
3.2.10.4. Colaboración con personal de Hospitales y del Biobanco CIBERER en la toma y procesamiento de las muestras de pacientes.....	100
3.2.10.5. Anotación de los datos clínicos en el CRDe (Cuaderno de Recogida de Datos electrónico) y monitorización de ensayo	100

3.2.11. Validación del prototipo del kit ScoliPro®	101
3.2.11.1. Descripción de la cohorte estudio para la evaluación de la función diagnóstica del kit ScoliPro®	101
3.2.11.2. Descripción de la cohorte estudio para la evaluación de la función pronóstica del kit ScoliPro®	101
3.2.11.3. Procesamiento de las muestras de plasma	101
3.2.11.4. Purificación de miARNs	101
3.2.11.5. Fabricación de kits	101
3.2.11.6. RT-qPCR	102
3.2.11.7. Estadística para la validación función diagnóstica kit ScoliPro®	102
3.2.11.8. Estadística validación función pronóstica kit ScoliPro®	103
4. RESULTADOS	104
.....	104
4.1. Evaluación de la sensibilidad de miARNs a la hemólisis	105
4.2. Optimización de la RT-qPCR en la plataforma LightCycler 480II (Roche)	112
4.2.1. Selección de diseños de cebadores.....	112
4.2.2. Evaluación de especificidad de cebadores.....	112
4.2.3. Optimización de la qPCR	114
4.2.3.1. Optimización de la Ta	114
4.2.3.2. Optimización de la concentración de cebadores F y R.....	119
4.2.3.3. Optimización de concentración de sonda.....	125
4.2.3.4. Validación de la qPCR.....	128
4.2.4. Optimización de la concentración de cebador de RT.....	131
4.3. Validación de la RT-qPCR en la plataforma LightCycler 480II (Roche).....	135
4.3.1. Evaluación de los parámetros de calidad de la RT-qPCR	135
4.3.1.1. Curvas preparadas sin dilución del cADN.....	136
4.3.1.2. Curvas preparadas con cADN diluido	140
4.3.2. Cálculo del LOC y LOD	145
4.3.3. Cálculo del LOC en base al <i>threshold</i>	148
4.3.4. Repetitividad (Variación intraensayo).....	149
4.3.5. Reproducibilidad (Variación interensayo).....	150
4.4. Evaluación de la RT-qPCR en el equipo QS5 (Thermo Fisher Scientific)	151
4.4.1. Evaluación de los parámetros de calidad de la RT-qPCR	151
4.4.1.1. Curvas preparadas sin dilución del cADN.....	151
4.4.1.2. Curvas preparadas con cADN diluido	155
4.4.2. Comparativa de la sensibilidad en los equipos LightCycler 480II (Roche) y QS5 (Thermo Fisher Scientific)	160

4.4.3. Cálculo del LOC y LOD	160
4.4.4. Cálculo del LOC en base al <i>threshold</i>	163
4.4.5. Comparativa LOC y LOD en los equipos LightCycler 480II (Roche) y QS5 (Thermo Fisher Scientific)	164
4.5. Estudio de isomiRs	165
4.6. Evaluación de las cantidades de entrada (<i>input</i>) de ARN y cADN.....	165
4.7. Evaluación de la sensibilidad y especificidad del método de RT-qPCR optimizado en la plataforma LightCycler 480 II (Roche) con muestras de plasma de pacientes	167
4.8. Diseño, desarrollo y fabricación del prototipo del kit basado en la tecnología de RT-qPCR en la plataforma LightCycler480 II (Roche)	168
4.8.1. Estudio con distintos volúmenes y formatos de placa de PCR	168
4.9. Validación del kit ScoliPro®	170
4.9.1. Función diagnóstica.....	170
4.9.2. Función pronóstica.....	178
4.10. Flujoograma para el diseño y optimización de RT-qPCR para la cuantificación miARNs	181
5. DISCUSION.....	184
5.1. Efecto de la hemólisis sobre los miARNs biomarcadores EIA	186
5.2. Estrategia del diseño de la RT-qPCR.....	190
5.2.1. Tecnología Taqman y <i>stem-loop</i> como metodología para la detección de miARNs	190
5.2.2. Método de cuantificación	192
5.3. Optimización de la RT-qPCR en la plataforma LightCycler 480II (Roche)	193
5.3.1. Especificidad de cebadores	194
5.3.2. Optimización de las condiciones de qPCR.....	196
5.3.2.1. Optimización de la Ta	196
5.3.2.2. Optimización de concentraciones de cebadores F y R.....	197
5.3.2.3. Optimización de la concentración de sonda	199
5.3.2.4. Validación de la qPCR.....	200
5.3.3. Optimización de la concentración de cebador de RT.....	201
5.4. Validación de la RT-qPCR en el equipo LightCycler 480II (Roche) y comparativa con el equipo QS5 (Thermo Fisher Scientific).....	202
5.4.1. Evaluación de los parámetros de calidad de la RT-qPCR	202
5.4.1.1. Evaluación de la pendiente	203
5.4.1.2. Evaluación de la eficiencia	203
5.4.1.3. Evaluación del rango dinámico lineal.....	205
5.4.1.4. Evaluación de R ²	206
5.4.2. Evaluación del cálculo LOC y LOD.....	206

5.4.2.1. Cálculo del LOC y LOD en el equipo LightCycler 480II (Roche)	207
5.4.2.2. Cálculo del LOC y LOD en el equipo QS5 (Thermo Fisher Scientific).....	208
5.4.2.3 Cálculo del LOC en Roche y QS5 en base al <i>threshold</i>	208
5.4.3. Repetitividad (variación intraensayo) y reproducibilidad (variación interensayo). 209	
5.5. Estudio de isomiRs	209
5.6. Evaluación de las cantidades de entrada (<i>input</i>) de ARN y cADN.....	210
5.7. Evaluación de la sensibilidad y especificidad del método de RT-qPCR optimizado en la plataforma LightCycler480II (Roche) con muestras de plasma de pacientes EIA.....	212
5.8. Evaluación del funcionamiento del kit Scolipro® en muestras de pacientes EIA.....	213
5.8.1. Evaluación de la función diagnóstica	213
5.8.2. Evaluación de la función pronóstica	215
5.9. Limitaciones del estudio y consideraciones generales	215
6. CONCLUSIONES	220
7. BIBLIOGRAFÍA.....	222
.....	222
ANEXOS	250

ABREVIATURAS

AJAP1: *Adherens junctions associated protein 1*

AOAC: *Association of Analytical Communities*

APC: *Tumour suppressor adenomatous polyposis coli protein*

ARN: *Ácido ribonucleico*

AUC: *Area under curve*

BBQ: *BlackBerry® quencher*

BHQ: *Black Hole quencher*

BLAST: *Basic local alignment search tool*

BM-MSCs: *Bone marrow mesenchymal stem cells*

BMP: *Bone morphogenic protein*

BMP1: *Bone morphogenic protein 1*

BQP: *Biomarker qualification program*

BqPCR: *Blanco de qPCR*

CBF α -1: *Core-binding factor subunit alpha-1*

CCR: *Cáncer colorrectal*

CDER: *Center for Drug Evaluation and Research*

CEIm: *Comité Ético de Investigación con Medicamentos*

CI: *Consentimiento informado*

CLSI: *Clinical Laboratory Standards Institute*

CRDe: *Cuaderno de recogida de datos electrónico*

CRO: *Contract Research Organization*

CSV: *Copy number variations*

Ct: *Cycle threshold*

CV: *Coeficiente de variación*

ddPCR: *droplet digital PCR*

DDQ: *Deep dark quencher*

DMRs: *Differential methylated regions*

EGFR: *Receptor del factor de crecimiento epidérmico*

EIA: Escoliosis Idiopática del Adolescente

EOS: Sistema de diagnóstico por imagen en 2D y 3D de baja radiación

EXPAR: *Exponential isothermal amplification reaction*

F: *Forward*

FDA: *Food and Drug Administration*

FFPE: *Formalin-fixed paraffin-embedded*

FGF2: Factor de crecimiento de fibroblastos 2

FRET: *Fluorescence resonance energy transfer*

GO: *Gene ontology*

GSK3B: *Glycogen synthase kinase 3B*

GWAS: *Genome-wide association study*

HAS2: Hialuronano sintasa 2

HDR: *Homology directed repair*

HI: Hoja de información al paciente

IBSP-CV: Investigación Biomédica y Salud Pública de la Comunidad Valenciana

ICH: *International Conference of Harmonization*

ISH: *In situ hybridation*

IT: Instructivos de trabajo

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*

IVD: *In vitro diagnostic*

LDT: *Laboratory developed test*

LAHS: *Ligase-assisted sandwich hybridization*

LBX1: *Ladybird homeobox 1*

LCR: *Ligase chain reaction*

lncRNA: *long non-coding RNAs*

LOC: *Limit of quantification*

LOD: *Limit of detection*

MGB: *Minor groove binder*

miARNs: microARNs

NFQ: *Nonfluorescent quencher*

NGS: *Next-Generation Sequencing*

NHEJ: *Non-homologous end joining*

NTC: *No template control*

ORA: *Over-representation analysis*

P1NP: Propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I

PAZ: Piwi/Argonaute/Zwille

Pb: Pares de bases

PITX1: *Pituitary homeobox 1*

PNT: Procedimiento normalizado de trabajo

PP2CB: *Protein-serine/threonine phosphatase 2CB*

PRS: *Poligenic Risk Score*

PS: Producto Sanitario

PTMs: *Post-translational modifications*

QS5: Sistema de PCR en tiempo real QuantStudio 5™

R: *Reverse*

R²: Coeficiente de correlación

RBCs: *Red Blood Cells*

RCA: *Rolling circle amplification*

RQ: Cantidad relativa

RT: Retrotranscripción o transcripción inversa

RT-qPCR: Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

RUNX2: *Runt-related transcription factor 2*

SD: Desviación estándar

SEXP: *Isothermal symmetric exponential amplification reaction*

SGC: Sistema de Gestión de la Calidad

SHUT: *Stacking-hybridized universal tag*

SmallRNA-seq: Secuenciación de ARNs pequeños

SMAT: *Single molecule real-time sequencing*

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Polimorfismo de único nucleótido

SRS: *Scoliosis Research Society*

STD: *Symmetric toehold dumbbell-template*

SUFU: *Suppressor of the fused homolog*

Ta: *Temperatura de annealing*

TIRCA: *Toehold-initiated rolling circle amplification*

Tm: *Temperatura de fusión o temperatura de melting*

TPRCA: *Target-primed rolling circle amplification*

TRACE: *Trunk aesthetic clinical evaluation*

Tsms: *True single molecular sequencing*

UA: *Unidades arbitrarias*

USP: *United States Pharmacopoeia*

UV: *Ultravioleta*

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

WGBS: *Whole genome bisulfite sequencing*

WT: *Wild type*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Escoliosis Idiopática del Adolescente (EIA)

1.1.1. Conceptos generales

La Escoliosis Idiopática del Adolescente (EIA) es una condición patológica de la columna vertebral en los adolescentes. La EIA se caracteriza por una deformación tridimensional de la columna que produce una desviación lateral, junto con traslación y rotación de la misma, de la cual, no se conoce la causa. Afecta al plano frontal, sagital y axial, responsable de la rotación vertebral. La EIA se identifica por la presencia radiográfica de una curva en el plano frontal, cuya magnitud de ángulo de Cobb (una medida de la curvatura de la columna vertebral y que se explica más adelante) es superior los 10° en pacientes con edades entre 10 y 18 años (Donzelli *et al.*, 2014). Esta enfermedad puede debutar en la adolescencia o en edades más tempranas con una deformación de la columna menor a 10°.

Los pacientes con EIA y curvas leves (ángulo de Cobb entre 10-20°) no parecen tener síntomas clínicamente importantes en la adolescencia. Sin embargo, tienen mayor probabilidad de tener problemas de salud a largo plazo, en la edad adulta, como deterioro de la función pulmonar, dolor de espalda que puede llegar a ser discapacitante, problemas psicológicos y una peor calidad de vida (John Dunn *et al.*, 2018). Pero el principal problema aparece cuando la curva progresa antes de que se alcance la madurez ósea. Esto ocurre aproximadamente en dos tercios de los casos y en el 10% de los pacientes, la EIA progresa hasta 40° en los siguientes años llegando a considerarse una escoliosis severa (figura 1). Es en estos casos en los que la EIA puede provocar una dolorosa osteoartritis espinal, deformidad progresiva, estenosis espinal con radiculopatía (pérdida o disminución de la función sensitiva o motora de una raíz nerviosa), fatiga muscular por el desequilibrio de los planos coronal y sagital, incluso puede llegar a afectar psicológicamente (Li *et al.*, 2011).

Los resultados muestran que el tratamiento conservativo, esto es mediante dispositivos ortopédicos como el corsé y posiblemente el tratamiento con ejercicios puede frenar la progresión de la curvatura en algunos adolescentes, hasta que estos alcancen la madurez ósea. Sin embargo, hay poca o ninguna evidencia sobre el efecto del diagnóstico temprano de la EIA y como la mejora en el tratamiento de los pacientes adolescentes puede tener un impacto en la salud cuando son adultos, sobre los resultados a largo plazo de los pacientes que han sido tratados con corsé, así como la asociación entre la curvatura en la madurez ósea del individuo y la salud del mismo (John Dunn *et al.*, 2018).

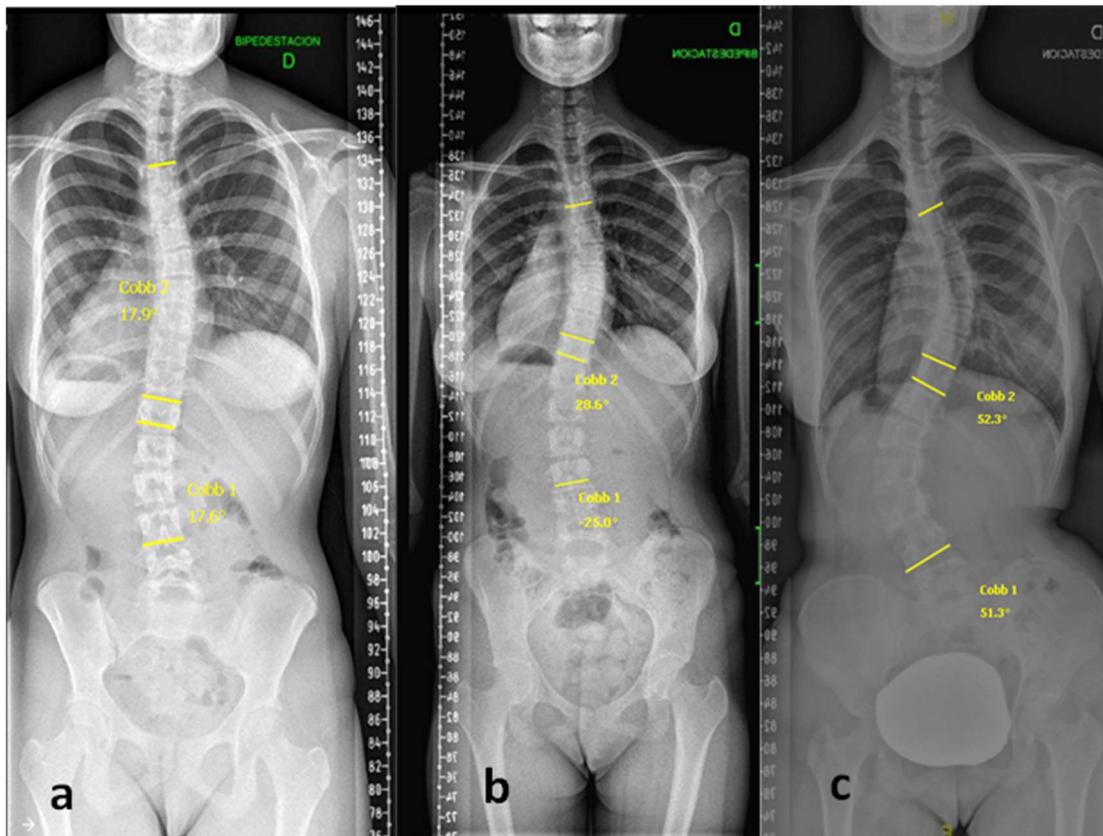


Figura 1. Radiografías de pacientes diagnosticados de EIA participantes en el estudio. A) Paciente con escoliosis leve. B) paciente con escoliosis moderada. C) paciente con escoliosis grave. Imágenes cedidas por la Dra. Bas de la Unidad de Raquis del Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia.

1.1.2. Epidemiología

La EIA ha sido considerada a nivel europeo una enfermedad rara, aunque en la última revisión de Orphanet se retiró del listado de enfermedades raras en Europa debido a la revisión de su incidencia. La EIA es la forma más común de escoliosis, afectando en mayor medida al género femenino (M. R. Konieczny, Senyurt and Krauspe, 2013)(Weinstein, 1999). Además, las mujeres premenárquicas tienen un mayor riesgo de progresión. En algunos casos, se agrava en la adolescencia antes de que se alcance la madurez ósea. Se estima que la prevalencia mundial de la EIA está entre el 0,5 y el 5,2%, pero la información disponible es escasa (M. R. Konieczny, Senyurt and Krauspe, 2013)(Fadzan and Bettany-Saltikov, 2017). La prevalencia de esta enfermedad está relacionada con la distribución geográfica y, aunque la prevalencia mundial es de aproximadamente del 3%, es más frecuente en zonas situadas en latitudes septentrionales que en las situadas en latitudes más bajas (Grivas *et al.*, 2006)(Cheng *et al.*, 2015). Los principales factores relacionados con la variación de los datos de prevalencia de la EIA son los factores genéticos, la edad y el sexo (Fadzan and Bettany-Saltikov, 2017). La tabla 1 muestra los datos del número de pacientes con EIA en todo el mundo, en los distintos países, así como el porcentaje de cada uno de ellos según el grado de severidad. En la tabla 2 se recoge la prevalencia de la EIA en los países europeos y el número de pacientes en cada uno de ellos según el ángulo de Cobb.

Muchos trabajos han descrito variaciones en la prevalencia de la EIA en diferentes países al comparar distintas etnias. Por ejemplo, Kamtsiuris y colaboradores (Kamtsiuris *et al.*, 2007) encontraron una mayor prevalencia de escoliosis en los niños alemanes que entre los niños inmigrantes cuando se controlaban los factores de confusión como el estatus social y la malnutrición. Otro estudio realizado en EE.UU. describió una mayor prevalencia de la escoliosis en la población afroamericana (9,7%) que en la caucásica (Carter OD, 1987).

La prevalencia y la gravedad de esta enfermedad difieren según el sexo, con una proporción mujer:hombre que oscila entre 1,4:1 para ángulos de Cobb inferiores a 20°, 2,8:5,4 para deformidades medias y 7,2:1 para curvaturas superiores a 40° (M. Konieczny, Senyurt and Krauspe, 2013).

Tabla 1. Prevalencia global de la EIA, número de pacientes con esta enfermedad en los distintos países y porcentaje de pacientes según el grado de severidad.

Región	Población total 10-18 (en millones)	Prevalencia	Estimación de pacientes con EIA
China	149.5	5.14%	7,625.000
Canadá	3.9	2.50%	99,000
Unión Europea	53.2	2.80%	1,340.000
Estados Unidos	42.2	2.50%	1,055.000
Australia	2.9	3.10%	91,000
Todo el mundo	1,208.8	3.00%	36,270.000

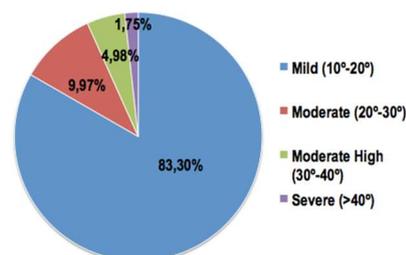


Tabla 2. Incidencia y número de pacientes con EIA en la Unión Europea divididos por país y por grado de la enfermedad en base al ángulo de Cobb.

EIA	Prevalencia	Media (10° - 20°)	Moderada (20° - 30°)	Moderada-alta (30° - 40°)	Severa (>40°)	Número de pacientes
España	2.0%	58,412	6,991	3,495	1,227	70,125
Italia	2.0%	75,562	9,043	4,522	1,587	90,713
Finlandia	7.0%	24,371	2,917	1,458	512	29,257
Reino Unido	4.0%	157,313	18,827	9,413	3,304	188,857
Alemania	5.2%	277,928	33,262	16,631	5,836	333,657
Francia	3.0%	121,079	14,491	7,245	2,543	145,358
Otros	3.3%	401,521	48,054	24,027	8,432	657,191
Total en la Unión Europea	2.8%	1,116,185	133,584	66,792	23,440	1,340.000

1.1.3. Fisiopatología

Alrededor del 20% de los casos de escoliosis se atribuyen a causas neuromusculares (parálisis cerebral, distrofia muscular, patología medular), sindrómicas o congénitas (defectos de formación o segmentación vertebral durante desarrollo uterino), mientras que casi el 80% de todos los casos se clasifican como "idiopáticos". Para determinar que se trata de un caso de

escoliosis idiopática han de descartarse las otras posibles causas en adolescentes. Además de las anteriormente citadas también pueden ser inflamatorias, infecciosas, patológicas (de origen tumoral), entre otras. Finalmente, la escoliosis idiopática se cataloga según la edad de inicio de los síntomas. La Sociedad Internacional para el Estudio de la Escoliosis (*Scoliosis Research Society* (SRS)) especifica los límites de edad entre los 10 y los 18 años de edad (Weinstein *et al.*, 2008)(Kim, Blanco and Widmann, 2009).

Mientras que la escoliosis congénita está causada por anomalías morfológicas en el desarrollo de las vértebras y normalmente está presente ya en el nacimiento (Giampietro, 2012), las causas de la EIA no están claras y es probable que sean multifactoriales. Se han propuesto varias hipótesis para explicar la etiopatogenia de EIA (Wang *et al.*, 2011)(Geoffrey Burwell *et al.*, 2013)(Burwell *et al.*, 2011)(Lowe *et al.*, 2000), desde procesos relacionados con la genética, el sistema nervioso central, el crecimiento de la columna vertebral, el metabolismo óseo, rutas metabólicas, factores endocrinos, hormonas sexuales (Skogland and Miller, 1980)(Kulis *et al.*, 2015)(Raczowski, 2007), biomecánicos, y más recientemente factores epigenéticos. Además, se ha propuesto que los factores relacionados con el crecimiento como el retraso en la pubertad, la osteopenia, la altura corporal y la laxitud, son factores de riesgo de EIA (Fadzan and Bettany-Saltikov, 2017)(Kikanloo, Tarpada and Cho, 2019).

Las revisiones publicadas por Fadzan y colaboradores (Fadzan and Bettany-Saltikov, 2017) y por Kikanloo y colaboradores (Kikanloo, Tarpada and Cho, 2019) recogen información sobre estas teorías. Ambos estudios muestran que la predisposición genética es el factor más estudiado. De hecho, se han encontrado varios linajes genéticos en la EIA (Aulisa *et al.*, 2007)(Zhang, Gu and Qiu, 2014) y se han estudiado algunas poblaciones con el objetivo de identificar variantes genéticas asociadas a la presencia de la enfermedad (A Grauers *et al.*, 2015)(J. F. Xu *et al.*, 2015)(Wang *et al.*, 2015)(Tang *et al.*, 2015).

No obstante, en general la complejidad de la EIA no sólo es debida a la predisposición genética sino también a la epigenética, condicionada por factores ambientales (por ejemplo, nutrición, virus, fármacos, toxinas, actividad física) que pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad. De hecho, Burwell y colaboradores describieron el papel del ambiente, el exposoma y la epigenética en la etiopatogenia de la EIA (Burwell *et al.*, 2011) (figura 2). Desde entonces, la epigenética ha abierto un área interesante de investigación que está contribuyendo a la comprensión de varios mecanismos moleculares que subyacen a la deformidad y la progresión de la columna vertebral.

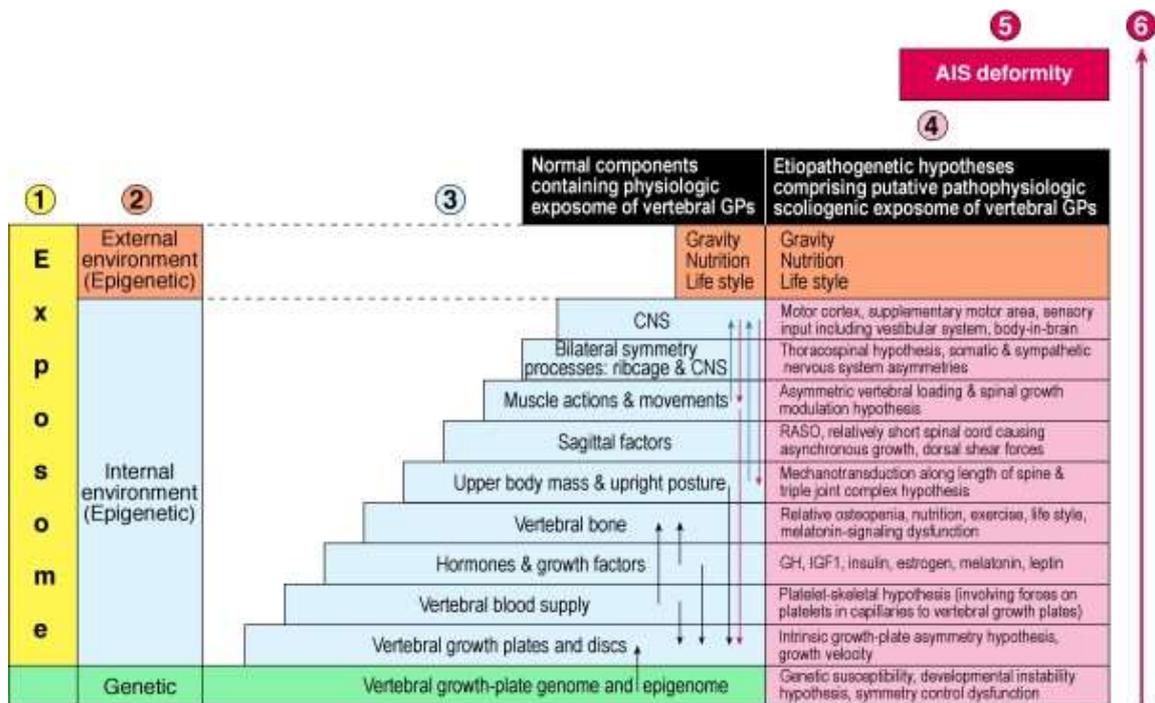


Figura 2. Propuesta de factores genéticos y epigenéticos que afectan al crecimiento de las placas vertebrales en pacientes con EIA (SNC = sistema nervioso central). De izquierda a derecha: 1) exposoma (amarillo); 2) ambiente externo (epigenética, naranja), ambiente interno (epigenética, azul) y genética (verde); 3) factores que controlan el crecimiento normal de las vértebras, genética (verde), ambiente interno (azul) y externo (naranja). Se considera que estos factores provocan cambios epigenéticos (flechas verticales) en las estructuras normales de las vértebras y contribuyen al epigenoma de las células del cartílago en crecimiento; 4) Hipótesis sobre la etiopatogenia de la EIA que incluye exposoma escoliográfico fisiopatológico (rosa) y la susceptibilidad genética (rosa); 5) deformidad resultante presente en la EIA (rojo); 6) la flecha roja vertical a la derecha representa los componentes fisiopatológicos craneocaudales que afectan al tronco a lo largo del tiempo y que conducen a la deformidad de la EIA. Fuente: (Burwell et al., 2011).

1.1.4. Manejo de la escoliosis idiopática en adolescentes

1.1.4.1. Cribado diagnóstico

La finalidad que persigue el programa de cribado es detectar la enfermedad en las fases iniciales de tal modo que se pueda empezar lo más precozmente el tratamiento para evitar la progresión y en última instancia la cirugía correctiva de la columna. Algunos aspectos positivos de aplicar estos programas de cribado son por un lado, minimizar el impacto psicológico en familiares y pacientes al ser remitidos al especialista y la realización de pruebas complementarias (Hines et al., 2015), por otro lado, disminuir el riesgo de cáncer en la edad adulta al evitar someter a los pacientes con EIA a continuas exposiciones a los rayos X durante la monitorización y seguimiento de la enfermedad, (Morin Doody et al., 2000)(Levy et al., 1996) y, en último lugar, reducir el sobrecoste que supone para el sistema de salud las visitas a especialistas y pruebas complementarias que en muchos casos resultan ser innecesarias.

Sin embargo, hoy en día no existen estudios aleatorizados de calidad que demuestren la eficacia del cribado en la EIA, y así lo establecen los dictámenes de los comités nacionales para el cribado de enfermedades del Reino Unido y de los Estados Unidos. Por tanto, no hay suficiente evidencia científica que avale las ventajas de su aplicación (Grossman *et al.*, 2018)(Deurloo and Verkerk, 2015)(Lee *et al.*, 2010). Además, este sistema de cribado es difícil de manejar debido a la dificultad de establecer cuál es la edad óptima para realizarlo, el criterio adecuado para establecer y optimizar las revisiones clínicas y la carencia de poder determinar, con las técnicas actuales, qué pacientes son los que progresaran a escoliosis más severas.

En concreto, el cribado se realiza en las consultas de atención primaria por los médicos de familia. Los métodos que se utilizan son la búsqueda de asimetrías en tronco y prueba de inclinación anterior de tronco de Adam (*Adam's test*). Con esta prueba se mide la prominencia torácica y/o lumbar con el escoliómetro, informando sobre el grado de rotación del tronco causado por la deformidad. Se recomienda medir en tres zonas: torácica, torácico-lumbar y lumbar. Aunque la SRS considera el diagnóstico de la escoliosis cuando el ángulo de Cobb está por encima de 10°, en el caso del escoliómetro se recomienda enviar al especialista cuando el ángulo es mayor o igual a 7°. Por otro lado, hay que considerar, respecto a la descripción de asimetrías del tronco, el TRACE (*trunk aesthetic clinical evaluation*), que evalúa la asimetría de hombros, tórax, escápulas y cintura lumbar.

El uso de estos dos métodos para el cribado de la enfermedad muestra, según el artículo publicado por el servicio de prevención de los Estados Unidos en 2018, una sensibilidad del 71.1% (Grossman *et al.*, 2018). Además, Fong y colaboradores a través de un metaanálisis determinaron la efectividad del cribado de EIA. Los resultados obtenidos mostraron un valor predictivo positivo del 28% para curvas con ángulo de Cobb menor a 10°, 5,6% para curvas por encima de 20° de Cobb y 2,6% en curvas severas en las que será necesario intervenir quirúrgicamente (Fong *et al.*, 2010).

1.1.4.2. Diagnóstico

Actualmente, para establecer si un paciente tiene EIA se han de cumplir tres características: 1) el ángulo de desviación en el plano coronal debe ser mayor a 10° (así lo indica la SRS), 2) se han de descartar otras causas de escoliosis y, 3) el paciente ha de tener entre 10 y 18 años.

Está definido que la técnica de rayos X (radiografía de torso completo) es la prueba complementaria que confirma si el paciente tiene EIA y cataloga la magnitud de la enfermedad y que, todo paciente con ángulo de Cobb mayor a 10° que todavía está en etapa de crecimiento necesitará de un seguimiento médico especializado. En definitiva, el método para el diagnóstico de la escoliosis idiopática se basa en la experiencia del clínico, en el tipo de curvatura de la columna vertebral y los ángulos de Cobb medidos en diferentes radiografías (Cobb, 1948). Con esta última técnica, se puede estimar la capacidad de progresión de la curva mediante la clasificación de Risser, la cual clasifica la osificación progresiva de la cresta iliaca en cinco grados (Risser grado 0-5). Los valores más altos de Risser describen el avance hacia la madurez ósea (J Dunn *et al.*, 2018). Los resultados de los rayos X, junto con los datos de menarquia, el desarrollo

de los caracteres sexuales secundarios y el ritmo de crecimiento del paciente, se utilizan para predecir el potencial de crecimiento y planificar la cirugía correctiva si esta resulta ser necesaria (Hacquebord and Leopold, 2012).

El manejo clínico de la EIA varía en función de la magnitud de la curva, su riesgo de progresión y de su evolución en el tiempo. Puede variar desde la simple observación, esto es revisiones clínicas y radiológicas en periodos de tiempo que dependen del criterio del especialista de columna; de la adaptación de un corsé para contener la deformidad y evitar su progresión, siempre que este tratamiento conservativo funcione; y en el caso de que no funcione el tratamiento conservativo esperar hasta tener una curva que requiera de intervención quirúrgica.

Aunque la técnica de rayos X está considerada como la técnica *gold standard*, la sensibilidad y especificidad de la misma es limitada (Oh *et al.*, 2012), no informando además, sobre el pronóstico de la enfermedad, es decir, el riesgo de progresión de la curva. Sin embargo, esta técnica se utiliza tanto para el diagnóstico, como ya se ha comentado, como para el seguimiento del paciente. De hecho, se ha descrito que algunos pacientes pueden llegar a someterse hasta una media de 24 radiografías de torso completo durante su seguimiento clínico (Deschênes *et al.*, 2010). Además, muchos estudios han evidenciado un aumento de padecer cáncer en la edad adulta como consecuencia de la exposición continua a los rayos X, ya que los pacientes jóvenes son más sensibles a la radiación que la población adulta y también, las mujeres tienen mayor susceptibilidad a sufrir cáncer de endometrio y de mama (Morin Doody *et al.*, 2000)(Ronckers *et al.*, 2010)(A Simony *et al.*, 2016). Siguiendo en esta misma línea, las radiografías pueden llevar a decisiones clínicas erróneas en el manejo de la enfermedad, ya sea privando a los pacientes de tratamiento adecuado o sometiéndolos a un tratamiento innecesario con los riesgos secundarios asociados (John Dunn *et al.*, 2018)(Ronckers *et al.*, 2010)(Ane Simony *et al.*, 2016).

Debido a los problemas de salud en los pacientes con EIA en la edad adulta asociados al uso de la técnica de rayos X, se trabaja en nuevos métodos que reduzcan la dosis de radiación ionizante. Recientemente se ha propuesto la utilización de filtros adicionales de cobre de 0.2 mm de manera que se reducen el 60% de la exposición a rayos X, sin reducir la calidad de la imagen (Minehiro *et al.*, 2019). Otro método es el de mapeo radiológico 2D y 3D de baja radiación (EOS, *Imaging, Biospace*, París, Francia)(Deschênes *et al.*, 2010)(Wybier and Bossard, 2013), el objetivo del cual es reducir la dosis de la radiación ionizante de entre 6 y 9 veces durante todo el seguimiento del paciente. Este método proporciona una calidad de la imagen incluso mayor a los rayos X. Sin embargo, tanto el equipamiento como la monitorización implican un coste mucho mayor que los rayos X (McKenna *et al.*, 2012), lo que hace que este equipamiento no esté disponible en la mayoría de hospitales. El EOS de micro-dosis, técnica mejorada del método EOS al incluir filtros de cobre, disminuye aún más la radiación respecto al EOS convencional. Sin embargo, la calidad de la imagen es menor por lo que solo se aconseja como herramienta para el seguimiento del paciente, pero no para el diagnóstico o pruebas preoperatorias (Morel *et al.*, 2018)(Newton *et al.*, 2016). Otra técnica alternativa de monitorización de la EIA propuesta por Diefenbach y colaboradores es la resonancia magnética en bipedestación. No obstante, aunque el coste de la técnica es similar al de la radiografía, no es posible aplicarla a enfermos que llevan implantes metálicos que no puedan retirarse, además de que en muchas clínicas privadas y centros de atención primaria no disponen de este equipo. Puesto que la técnica se lleva a cabo

con el paciente en bipedestación y por tanto, no hay posibilidad de anestesia, es complicado llevarla a cabo con pacientes afectados de EIA con incapacidad de mantenerse en pie, con patología neuromuscular, entre otros (Diefenbach *et al.*, 2013). En otra técnica se utilizan escáneres láser para captar la geometría tridimensional del tronco del paciente, permitiendo clasificarlo según su gravedad y determinar cómo ha evolucionado el paciente (Hong *et al.*, 2017). Se trata de un método sensible, muy útil para los pacientes con curvaturas entre 10-25° y para aquellos que progresan lentamente (Hong *et al.*, 2017). Finalmente, la última técnica de diagnóstico alternativa a los rayos X para la monitorización de la EIA es la ecografía. Sin embargo, la información que proporciona es muy limitada. Recientemente Ferrás y colaboradores han publicado un estudio basado en la ultrasonografía, un método accesible y económico pero que no permite evaluar la rotación axial o sagital (Ferràs-Tarragó *et al.*, 2019).

Dejando de lado las técnicas de diagnóstico alternativas a los rayos X y centrándonos de nuevo en la enfermedad, es importante predecir la deformación futura de la columna y por lo tanto establecer la gravedad de la escoliosis, e incluso establecer si el uso de corsé tendrá un efecto terapéutico en los pacientes de EIA. La escoliosis progresiva tiene varias consecuencias, entre ellas el coste del tratamiento, la deformidad estética de la espalda en los adolescentes, baja calidad de vida, discapacidad, dolor de espalda crónico, efectos sociopsicológicos, e incluso limitaciones funcionales y pulmonares en los casos más graves (John Dunn *et al.*, 2018). El tratamiento con corsé no corrige la curvatura, sino que ralentiza o detiene la progresión de esta y el agravamiento de la enfermedad. Por lo tanto, el corsé está indicado principalmente para pacientes que no han alcanzado la madurez ósea, en los cuales es más probable la progresión de la curvatura. La intervención quirúrgica es la última opción, indicada para pacientes que no han alcanzado la madurez ósea y que tienen curvas de más de 45-50° (Murphy and Mooney, 2016). En un estudio llevado a cabo en EEUU con más de 75.000 pacientes diagnosticados de EIA, se identificaron algunas de las complicaciones postquirúrgicas, las cuales incluyeron complicaciones neurológicas, respiratorias, cardíacas, gastrointestinales, insuficiencia renal e infecciones después de la cirugía (Menger *et al.*, 2017)(Carreon *et al.*, 2007)(Cook *et al.*, 2000). En otro estudio se estimó que el 21% de las intervenciones quirúrgicas requieren la retirada del implante, en más de un 50% de los pacientes tratados quirúrgicamente se produjeron fallos en la fusión y hasta el 40% de los pacientes adultos que habían sido operados tienen que ser sometidos a cirugías de rescate (Weiss and Goodall, 2008).

Por tanto, ante esta situación, es necesario el uso de nuevas herramientas que mejoren el manejo clínico de los pacientes de EIA. Entre estas posibles herramientas están los biomarcadores que pueden facilitar la detección temprana de la enfermedad, determinar cuál va a ser el pronóstico del enfermo/a, e incluso establecer la mejor pauta terapéutica. Por tanto, los biomarcadores podrán identificar aquellos pacientes que pueden responder favorablemente al tratamiento con corsé así como aquellos que tendrán una respuesta positiva a la intervención quirúrgica (K. Wang *et al.*, 2016)(Marabita *et al.*, 2016)(Sun *et al.*, 2016)(Burton, 2013)(Labelle *et al.*, 2013)(Xu *et al.*, 2011).

1.1.4.3. Tratamiento ortopédico y quirúrgico

En el momento del diagnóstico de la enfermedad el criterio que se sigue para pautar a un paciente el tratamiento conservativo con corsé se basa en la magnitud y el riesgo de progresión de la curva. La progresión depende de la localización de la curva o curvas, será mayor cuando la magnitud de la curva sea mayor y cuando menor sea el grado de madurez ósea del paciente (tabla 3) (Weinstein, 2019)(Nachemson *et al.*, 1995)(Lonstein *et al.*, 1984).

Tabla 3. Aproximación sobre el tratamiento pautado a pacientes con EIA en base al Risser y el ángulo de Cobb (Stokes and Luk, 2013).

Risser	Ángulo de Cobb	Tratamiento
0-1	0° a 20° Cobb	Observación
0-1	20° a 40° de Cobb	Corsé
2-3	0° a 30° de Cobb	Observación
2-3	30° a 40° de Cobb	Corsé
0-3	40° a 50° de Cobb	Corsé vs Cirugía
0-4	>50° de Cobb	Cirugía

El tratamiento con corsé aplica fuerzas externas para guiar el crecimiento de la columna y tiene como objetivo que el paciente alcance la madurez ósea con un ángulo de Cobb por debajo de los 50°, de tal forma el riesgo de progresión en la edad adulta sea menor.

1.1.5. Bases genéticas propuestas para la EIA

La implicación de los factores genéticos en la EIA ha sido reconocida desde hace más de un siglo (Fadzan and Bettany-Saltikov, 2017)(Grauers *et al.*, 2013)(Tang *et al.*, 2012). Grauers y colaboradores utilizando datos del Registro Sueco de Gemelos (Grauers, Rahman and Gerdhem, 2012), confirmaron la heredabilidad de la escoliosis y que aquellos pacientes que tenían antecedentes familiares con esta enfermedad tenían un riesgo ligeramente mayor de requerir un tratamiento (Grauers *et al.*, 2013). Asimismo, Tang y colaboradores (Tang *et al.*, 2012) demostraron en una cohorte de mujeres chinas con EIA, que este riesgo de heredabilidad era del 18%, mientras que Watanabe y colaboradores informaron de que la *odds ratio* (OR) para de desarrollar escoliosis era 1,5 veces mayor en las participantes cuyas madres habían tenido escoliosis (Watanabe *et al.*, 2017). Estudios epidemiológico-genéticos recientes muestran que la EIA es una enfermedad poligénica que resulta de la interacción de múltiples *loci*, donde además contribuyen los efectos ambientales (Cowell, Hall and MacEwen, 1973)(Ward *et al.*, 2010)(Moon *et al.*, 2013). No obstante, la heterogeneidad genética sigue siendo un obstáculo para establecer conclusiones claras sobre la base genética de la EIA. Si, además, se añaden las limitaciones de los diseños de los estudios (son pocos los estudios realizados que apoyan cada hallazgo y la replicabilidad en diferentes poblaciones es baja), se puede entender que la capacidad predictiva actual de los estudios de genotipado sea limitada (Fadzan and Bettany-Saltikov, 2017)(Noshchenko *et al.*, 2015).

Los estudios de ligamiento genético, de genes candidatos así como los estudios de asociación del genoma completo (*Genome-wide association study*, GWAS), son herramientas poderosas

para analizar la base genética de una enfermedad poligénica como es la EIA (Geoffrey Burwell *et al.*, 2013)(Peng *et al.*, 2020).

La tabla 4 recoge los alelos de riesgo más importantes obtenidos de 10 estudios relevantes y 1387 asociaciones publicadas. En esta tabla se indica el nivel de significatividad, teniendo en cuenta que la calidad y la fiabilidad de los resultados de GWAS dependen del tamaño de la población, la estratificación, las diferencias étnicas y los factores ambientales.

En GWAS se han detectado múltiples *loci* en los cromosomas 6, 9, 16 y 17, que pueden estar relacionados con una predisposición a sufrir EIA (Ogura *et al.*, 2015)(Kou *et al.*, 2019)(Miyake *et al.*, 2013)(Sharma *et al.*, 2015)(Kou *et al.*, 2013)(Zhu *et al.*, 2015)(Takahashi *et al.*, 2011)(Ogura *et al.*, 2017)(Anas M. Khanshour *et al.*, 2018)(J. Liu *et al.*, 2018), siempre teniendo en cuenta que algunas variantes pueden estar asociadas a la aparición de la escoliosis, mientras que otras están relacionadas con el riesgo de progresión (Ridley, 2009). Lamentablemente, estas últimas apenas se han estudiado (Noshchenko *et al.*, 2015).

En estudios llevados a cabo con cohortes de mujeres estadounidenses, japonesas (Sharma *et al.*, 2015) y chinas (Xu *et al.*, 2018) se observó una asociación significativa entre la EIA y las variantes genéticas (rs6137473 y rs169311) del gen *paired box (PAX1)*, que codifica un factor de transcripción que participa en la formación de las somitas, material mesodérmico que se ubica alrededor del tubo neural del embrión y que van a formar la dermis de la piel dorsal, las vértebras y las costillas, los músculos esqueléticos de la espalda, de las extremidades y de la pared corporal (Sharma *et al.*, 2015). Se detectó una baja expresión de *PAX1* en pacientes con el alelo de riesgo rs169311. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de *PAX1* en ninguno de los genotipos rs6137473. Los autores dedujeron que el polimorfismo de único nucleótido (SNP, siglas en inglés) rs169311 podría ser una variante funcional que regula la expresión de *PAX1* en los músculos paraespinales de EIA, sin embargo, podría ser que no estuviese implicado en la progresión de la enfermedad (Xu *et al.*, 2018). Además, se ha descrito otro *locus* en *PAX1* asociado a la EIA (Xu *et al.*, 2018)(Anas M. Khanshour *et al.*, 2018)(Zhu *et al.*, 2017), el rs6047663, situado 90 kb aguas abajo del gen. De hecho, el análisis de expresión génica de tejido de músculo paraespinal de pacientes con EIA mostró una expresión significativamente menor de *PAX1*, y también de *TNIK*, *TCF4*, *PAX3*, *LBX1* (*Ladybird Homeobox 1*), *MYOD*, *MEIS1* en el lado cóncavo en comparación con el lado convexo (Zhu *et al.*, 2017). Estos genes pusieron de manifiesto por primera vez el papel de la vía Wnt/ β -catenina en el desarrollo de la EIA (Xu *et al.*, 2018). Varios estudios coinciden en el importante papel de *PAX1* en la esquelotogénesis axial, incluida la condrogénesis, el cuerpo vertebral derivado del esclerotoma y el desarrollo del disco intervertebral (DIV) (Sharma *et al.*, 2015)(Anas M. Khanshour *et al.*, 2018)(Liu, Liu, *et al.*, 2019)(Grauers, Einarsdottir and Gerdhem, 2016), por lo que su deficiencia o mutación podría conducir a síndromes que manifiesten escoliosis (Xu *et al.*, 2018).

Otro estudio GWAS en poblaciones chinas identificó un nuevo *locus* de susceptibilidad a la EIA, rs7633294, el cual se encuentra en 3p14.1, cerca de *MAGI1* y con el que se confirmó el papel de las variantes *MEIS1* (rs7593846) y *TNIK* (rs9810566) en el inicio de la EIA. El análisis funcional señaló al rs9810566 como el candidato más convincente. Anteriormente, se determinó que *TNIK* era un componente regulador del complejo transcripcional β -catenina y que *MAGI1* era una molécula importante para la estabilización de las interacciones celulares mediadas por

cadherina. Sin embargo, la expresión de *MAGI1* no se ha detectado en el músculo paraespinal de pacientes con EIA. Durante el desarrollo de la columna vertebral, *MAGI1* recluta varias moléculas para fortalecer las uniones de adhesión entre las células y activar distintas rutas celulares (Mizuhara *et al.*, 2005). Se ha propuesto como un regulador en la señalización Wnt/ β -catenina en las células del cáncer de colon. La expresión de *MEIS1* también se ha relacionado con la β -catenina, lo cual sugiere que *MEIS1* es un gen prometedor que podría explicar la relación entre la vía Wnt/ β -catenina y la EIA (Zhu *et al.*, 2017).

Tabla 4. SNPs, identificados a través de estudios de GWAS, con mayor nivel de significatividad asociados con EIA.

Gen	Nombre del gen y función	SNP alelo de riesgo	Ubicación	OR- (95% CI)	p-valor	Referencia GWAS
<i>FOXA2</i> , <i>PAX1</i>	<i>Forkhead Box A2</i> , interviene en el desarrollo embrionario, el establecimiento de la expresión génica específica de un tejido y la regulación de la expresión génica en los tejidos diferenciados. En el desarrollo embrionario es necesario para la formación de la notocorda. <i>Paired box 1</i> , implicado en la esqueletogénesis axial (condrogénesis, cuerpo vertebral derivado del esclerotoma y desarrollo del disco intervertebral). Juega un papel importante en la formación de patrones durante la embriogénesis.	rs6137473-G comienzo, aparición	Intergénica	1.30 [1.19–1.41]	3,00E-08	(Sharma <i>et al.</i> , 2015)(Xu <i>et al.</i> , 2018) (Zhu <i>et al.</i> , 2017)(Grauers, Einarsdottir and Gerdhem, 2016)
<i>PAX1</i>	<i>Paired box 1</i> , implicado en la esqueletogénesis axial (condrogénesis, cuerpo vertebral derivado del esclerotoma y desarrollo del disco intervertebral). Juega un papel importante en la formación de patrones durante la embriogénesis.	rs169311-A comienzo, aparición	Intergénica	1.51(1.28–1.78)	1.25E-06	(Sharma <i>et al.</i> , 2015)(Xu <i>et al.</i> , 2018)
		rs6047663-G comienzo, aparición	Región reguladora	1.22 (1.12–1.34)	2,00E-15	(Anas M Khanshour <i>et al.</i> , 2018)(Zhu <i>et al.</i> , 2017)
<i>TNIK</i>	<i>TRAF2 And NCK Interacting Kinase</i> , codifica para una proteína serina/treonina quinasa que actúa como activadora de la ruta Wnt β -catenina.	rs9810566-A comienzo, aparición	Intrón	1.19 (1.08–1.32)	1,00E-11	(Zhu <i>et al.</i> , 2017)(L. Xu <i>et al.</i> , 2019)
<i>MAG1</i>	<i>Membrane Associated Guanylate Kinase, WW And PDZ Domain Containing 1</i> , molécula importante para la estabilización de las interacciones celulares mediadas por cadherina. Durante el desarrollo de la columna vertebral, MAG1 recluta varias moléculas para fortalecer las uniones de adhesión entre las células (desempeñar un papel como proteína de andamiaje en las uniones célula-célula) y activar distintas rutas celulares.	rs7633294-G comienzo, aparición	Intrón	1.20 (1.09–1.32)	2,00E-12	(Zhu <i>et al.</i> , 2017)(L. Xu <i>et al.</i> , 2019)

<i>MEIS1</i>	<i>Meis Homeobox 1</i> , gen homeobox, cuya categoría más caracterizada está representada por los genes HOX, desempeñan un papel crucial en el desarrollo normal. La expresión de MEIS1 también se ha relacionado con la β -catenina.	rs7593846-G comienzo, aparición	Intrón	1.21 (1.10–1.32)	1,00E-13	(Zhu <i>et al.</i> , 2017)(L. Xu <i>et al.</i> , 2019)
<i>BNC2</i>	<i>Basonuclin 2</i> , se expresa en gran medida en los tejidos musculoesqueléticos, en hueso y cartílago. Se sugiere que desempeña un papel en la neuropatía y en el crecimiento musculoesquelético anormal	rs3904778-G comienzo, aparición	Intrón	1.21 [1.14–1.28]	5,00E-08	(Yoji Ogura, Takeda, <i>et al.</i> , 2018)
		rs10756785- ? comienzo, aparición	Intrón	1.21 [1.14–1.28]	7,00E-10	(Anas M Khanshour <i>et al.</i> , 2018)
<i>LBX1</i>	<i>Ladybird Homeobox 1</i> , se expresa durante la embriogénesis (expresión restringida al desarrollo del sistema nervioso central y los músculos). Participa en la regulación transcripcional y la determinación del linaje celular (migración de linajes musculares y especificación de subtipos neuronales) en el cerebro y la médula espinal. Participa en la regulación <i>downstream</i> de la ruta Wnt/beta-catenina. Principal <i>locus</i> de susceptibilidad a EIA en asiáticos y blancos no hispanos.	rs11190870- T comienzo, aparición	Intergénica	1.61 [1.50–1.73]	5,00E-39	(Anas M Khanshour <i>et al.</i> , 2018)(Giampietro, 2015)(L. Xu <i>et al.</i> , 2015)(Kou <i>et al.</i> , 2018)(D Londono <i>et al.</i> , 2014) (Jiang <i>et al.</i> , 2019)(Kou <i>et al.</i> , 2018)
		rs678741-G comienzo, aparición	Intrón	1.44[1.37–1.52]	1,00E-36	(Zhu <i>et al.</i> , 2015)(Xu <i>et al.</i> , 2019)(Xu <i>et al.</i> , 2019)(Jiang <i>et al.</i> , 2019)(Kou <i>et al.</i> , 2018)(Y Cao <i>et al.</i> , 2016)(Nada <i>et al.</i> , 2018)
<i>BCL2</i>	<i>B-cell lymphoma-2</i> , codifica para una proteína integral de la membrana mitocondrial externa que desempeña un papel clave en la apoptosis. Regula la actividad de los osteoblastos, el proceso de osificación endocondral y su sobreexpresión puede inhibir la diferenciación de los osteoblastos	rs4940576-T comienzo, aparición	Intrón	1.35 [1.22–1.48]	2,00E-09	(Zhu <i>et al.</i> , 2015)(Xu <i>et al.</i> , 2019) (Xu <i>et al.</i> , 2019)
<i>AJAP1</i>	<i>Adherens Junctions Associated Protein 1</i> , codifica para una proteína transmembrana que interactúa con el complejo E-cadherina/b-catenina y el complejo de proteínas adaptadoras AP-1B en las células epiteliales polarizadas. Participa en la interacción célula-célula y	rs241215-G comienzo, aparición	Intergénica	1.33 [1.19–1.47]	5,00E-07	(Zhu <i>et al.</i> , 2015)(Xu <i>et al.</i> , 2019)(Man <i>et al.</i> , 2019)(Man <i>et al.</i> , 2019)

	<p>célula-matriz extracelular que podrían estar implicadas en la adhesión, migración e invasión celular. La regulación de la adhesión celular es esencial en el crecimiento óseo y la diferenciación de los osteoblastos.</p>					
<p><i>PAX3/EPHA4</i></p>	<p><i>Paired Box 3</i>, miembro de la familia de factores de transcripción <i>Paired Box (PAX)</i>, los cuales desempeñan un papel fundamental durante el desarrollo fetal. En concreto regulan la miogénesis y la neurogénesis del tubo neural. El tubo neural/notocordio tiene una función crítica durante el desarrollo del músculo vertebral. Se ha propuesto como causa de la EIA una anomalía de los músculos paravertebrales.</p> <p><i>EPH Receptor A4</i>, <i>EPHA4</i> pertenece a la subfamilia de receptores EPH de la familia de las proteínas tirosina-quinasa. Los receptores EPH están implicados en la mediación de eventos del desarrollo, especialmente en el sistema nervioso.</p>	<p>rs13398147-T comienzo, aparición</p>	<p>Intergénica</p>	<p>1.38 [1.23–1.54]</p>	<p>3,00E-08</p>	<p>(Zhu <i>et al.</i>, 2015)(Xu <i>et al.</i>, 2019)(Man <i>et al.</i>, 2019)(Man <i>et al.</i>, 2019)</p>
<p><i>GPR126</i></p>	<p><i>Adhesion G Protein-Coupled Receptor G6</i>, se expresa en gran medida en el cartílago humano y en condrocitos en proliferación en el embrión de ratón, lo cual sugiere que <i>GPR126</i> puede afectar tanto a la susceptibilidad de la EIA como al desarrollo y/o crecimiento anormal de la columna vertebral. Estudios en animales modelo muestran la implicación de <i>GPR126</i> tanto en el crecimiento como en la osificación de la columna vertebral en desarrollo, así como en el desarrollo neurológico. <i>GPR126</i> puede afectar a la susceptibilidad de la EIA a través de los tejidos adiposos. Estos pacientes se caracterizan por tener peso corporal e índice de masa corporal (IMC) bajo, y así como menor grasa corporal.</p>	<p>rs6570507-A comienzo, aparición</p>	<p>Intrón</p>	<p>1.23 [1.16–1.3]</p>	<p>7,00E-13</p>	<p>(J. F. Xu <i>et al.</i>, 2015)(Ogura <i>et al.</i>, 2015)(Kou <i>et al.</i>, 2018)(Man <i>et al.</i>, 2019)(Yoji Ogura, Matsumoto, <i>et al.</i>, 2018)(Villa, 2015)</p>

<p>SOX9, KCNJ2</p>	<p><i>SRY-Box Transcription Factor 9</i>, regulador transcripcional de la condrogénesis y la formación de cartílago.</p> <p><i>Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 2</i>, codifica para un canal de potasio. Probablemente participa en la creación del potencial de acción y la excitabilidad de los tejidos neuronales y musculares. Se ha asociado con malformaciones esqueléticas, incluida la escoliosis progresiva.</p>	<p>rs12946942-T, progresión</p>	<p>Intergénica</p>	<p>2.21 [1.76–2.77]</p>	<p>6,00E-12</p>	<p>(Anna Grauers <i>et al.</i>, 2015)(Noshchenko <i>et al.</i>, 2015)(Grauers, Einarsdottir and Gerdhem, 2016) (Man <i>et al.</i>, 2019)(Villa, 2015)(Chettier, Nelson, James W Ogilvie, <i>et al.</i>, 2015)(Ikegawa, 2016)(Takeda <i>et al.</i>, 2019)</p>
<p>CDH13</p>	<p><i>Cadherin 13</i>, se expresa en cartílago articular adulto. Además, posible función en el cartílago en desarrollo. Durante el desarrollo, se sugiere que puede actuar como una señal de orientación negativa para el crecimiento axonal. En el desarrollo temprano se expresa también en el esclerotoma. CDH13 podría estar relacionada con la EIA al estar implicada en la propiocepción, dado que se ha propuesto que los mecanismos propioceptivos son esenciales para mantener una alineación adecuada de la columna vertebral y para prevenir potencialmente la escoliosis.</p>	<p>rs4513093-A comienzo, aparición</p>	<p>Intrón</p>	<p>1.23 [1.18–0.01]</p>	<p>2,00E-15</p>	<p>(Anas M Khanshour <i>et al.</i>, 2018)(Wu <i>et al.</i>, 2019)</p>

Es importante destacar los resultados que se obtuvieron de un metaanálisis realizado para evaluar la asociación de *BNC2* (rs3904778 y rs10756784) con la EIA. En él se reclutaron ocho cohortes multiétnicas, incluyendo japoneses, chinos y caucásicos. En siete de estas cohortes étnicas se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, demostrando que el *locus BNC2* está relacionado con el riesgo de sufrir EIA (Ogura *et al.*, 2015)(Anas M. Khanshour *et al.*, 2018). Los resultados *in vitro* e *in vivo* refuerzan la idea de que el aumento de la expresión de *BNC2* predispone a padecer EIA (Grauers, Einarsdottir and Gerdhem, 2016). *BNC2* se expresa en gran medida en los tejidos musculoesqueléticos, en hueso y cartílago, pero aún no se conoce el mecanismo por el cual este gen causa la EIA. Sin embargo, los resultados sugieren que este gen desempeña un papel en la neuropatía y en el crecimiento musculoesquelético anormal, los cuales están relacionados con la etiología de la EIA (Ogura *et al.*, 2015).

Son muchos los estudios en los que se ha evaluado la asociación entre los SNPs del gen *Ladybird Homeobox 1 (LBX1)* y la EIA (Zhu *et al.*, 2015)(Anas M. Khanshour *et al.*, 2018)(Ridley, 2009)(Xu *et al.*, 2018)(Grauers, Einarsdottir and Gerdhem, 2016)(L. Xu *et al.*, 2019)(Y Ogura *et al.*, 2018)(L. Xu *et al.*, 2015)(Kou *et al.*, 2018)(Jiang *et al.*, 2019)(Yaqin Cao *et al.*, 2016)(Villa, 2015)(Kou *et al.*, 2013)(Chettier, Nelson, James W. Ogilvie, *et al.*, 2015)(Gao *et al.*, 2013)(Jiang *et al.*, 2013)(Fan *et al.*, 2012)(Li *et al.*, 2018)(L. Xu *et al.*, 2019)(Kouwenhoven and Castelein, 2008)(G. Liu *et al.*, 2018)(Qin *et al.*, 2017). Aunque algunos han resultado contradictorios, en la mayoría de los estudios se establece que los polimorfismos del gen *LBX1* están implicados en la etiología de la EIA. La variante rs11190870 es una de las más robustas para determinar el riesgo de padecer EIA ya que se ha encontrado en múltiples orígenes étnicos (Ridley, 2009). Takahashi y colaboradores encontraron una asociación entre la EIA y rs11190870, el cual se localiza, en la población japonesa, corriente abajo (*downstream*) del gen *LBX1* (Takahashi *et al.*, 2011); este hallazgo se encontró también en poblaciones chinas y caucásicas (Sharma *et al.*, 2015)(Grauers, Einarsdottir and Gerdhem, 2016)(Fan *et al.*, 2012). Las evidencias significativas de asociación entre rs11190870 y la susceptibilidad a la EIA en las nueve cohortes estudiadas, permitió identificar al gen *LBX1* como el principal *locus* de susceptibilidad a esta enfermedad en asiáticos y blancos no hispanos (Douglas Londono *et al.*, 2014)(L. Xu *et al.*, 2015). Un metaanálisis llevado a cabo recientemente sobre los polimorfismos del gen *LBX1* en la patogenia de la EIA mostró que, mientras que el alelo T de rs11190870, y los alelos G de rs625039 y rs11598564, representan factores de riesgo para la EIA, el alelo G de rs678741 puede desempeñar un papel protector en la aparición de la enfermedad. Este último alelo se encuentra en una región potenciadora (*enhancer*) caracterizada por tener varios sitios activos de modificaciones de histonas, por tanto, se trata de una región en la que se puede regular la actividad transcripcional del gen en cuestión (Jiang *et al.*, 2019)(Man *et al.*, 2019).

Para evaluar el riesgo individual, se ha hecho hincapié en la utilidad del análisis de haplotipos en vez del uso de SNP. Se identificaron seis haplotipos en el *locus LBX1*, incluyendo dos clínicamente relevantes para el riesgo de EIA, pero con efectos opuestos: un haplotipo de riesgo recesivo (TTA) y un haplotipo protector codominante (CCG) (Chettier, Nelson, James W. Ogilvie, *et al.*, 2015).

El gen *LBX1* se expresa durante la embriogénesis, con una expresión restringida al desarrollo del sistema nervioso central y los músculos (Kou *et al.*, 2018). Las proteínas Lbx participan en la regulación transcripcional y la determinación del linaje celular, incluyendo la migración de

linajes musculares y la especificación de subtipos neuronales en el cerebro y la médula espinal (Ridley, 2009). Así pues, *LBX1* podría estar implicado en la etiología miogénica y neurogénica de la EIA (Grauers, Einarsdottir and Gerdhem, 2016)(Ikegawa, 2016). Es importante destacar que se ha reportado que el gen *LBX1* está implicado en el control *downstream* de la ruta Wnt/beta-catenina (Zhu *et al.*, 2015)(J. L. García-Giménez *et al.*, 2018).

También se han identificado SNPs en el gen del linfoma de células B2 (*BCL2*), este es uno de los *loci* más comunes asociados con la EIA (Wu *et al.*, 2019). El SNP rs4940576 codifica para una proteína integral de la membrana mitocondrial externa que desempeña un papel clave en la apoptosis (Zhu *et al.*, 2017), y que tiene mayor expresión en condrocitos en proliferación y de maduración tardía (Seibel, Robins and Bilezikian, 2006). *BCL2* regula la actividad de los osteoblastos, el proceso de osificación endocondral y su sobreexpresión puede inhibir la diferenciación de los osteoblastos (Ridley, 2009)(L. Xu *et al.*, 2019). Curiosamente, el crecimiento excesivo de la placa vertebral anterior es la hipótesis clásica utilizada para explicar la etiopatogenia de la EIA (Kouwenhoven and Castelein, 2008). Por tanto, esta variante se incluyó en un modelo de riesgo predictivo de aparición de la EIA (L. Xu *et al.*, 2019).

Estudios recientes de GWAS mostraron la asociación entre la EIA y los SNPs en el gen del receptor 126 acoplado a proteínas G (*GPR126*)(Giampietro, 2015). El SNP más significativo fue el rs6570507, que ha sido reportado en poblaciones chinas, japonesas, americanas y de ascendencia europea (Kou *et al.*, 2013)(Ikegawa, 2016)(G. Liu *et al.*, 2018)(Qin *et al.*, 2017)(E. Xu *et al.*, 2019). El gen *GPR126* se expresa en gran medida en el cartílago humano. Por otro lado, la pérdida condicional de *Gpr126* en ratones produce un fenotipo de escoliosis idiopática de aparición tardía (Anas M. Khanshour *et al.*, 2018)(Ikegawa, 2016).

Los resultados muestran una asociación entre el *locus* rs12946942 y la severidad de la progresión de la curva. Este gen está localizado entre los genes *SOX9* y *KCNJ2*. *SOX9* es un regulador transcripcional de la condrogénesis y la formación de cartílago. El gen *KCNJ2* codifica para un canal de potasio y se ha asociado previamente con malformaciones esqueléticas, incluida la escoliosis progresiva. Por último, una variante funcional, rs35333564 en *MIR4300HG*, el gen huésped de un microARN, miR-4300, se relacionó con la progresión de la EIA (Wise and Ikegawa, 2018).

En cuanto a los métodos basados en el uso de variantes genéticas, se ha desarrollado un algoritmo pronóstico basado en 53 SNPs identificados, mediante GWAS, en cohortes caucásicas de EE.UU. Sin embargo, estos marcadores implementados en el test Scoliscore™, no fueron confirmados en afroamericanos con EIA, y los resultados no fueron reproducibles ni en cohortes japonesas, ni franco-canadienses (Ogura *et al.*, 2013)(Tang *et al.*, 2015). En cambio, al genotipar pacientes de población del grupo étnico de los Han en China con el test Scoliscore™ permitió identificar cuatro genes nuevos de predisposición a EIA (*BIN1*, *CDH13*, *SETBP1* y *SPATA21*) (L. Xu *et al.*, 2015).

Un tema que merece especial atención cuando se trata el riesgo genético de una enfermedad poligénica como la EIA es la puntuación de riesgo poligénico (PRS, siglas en inglés). Aunque si se evalúan las contribuciones biológicas de los factores de riesgo genéticos de manera individual la contribución es pequeña, se sugiere que la suma de los efectos de los genes sí contribuye a determinar el riesgo de la EIA. Por tanto, el PRS es un método que suma los efectos de las

variantes comunes de todo el genoma ponderándolos por la magnitud de sus efectos. El PRS se propone como un indicador beneficioso de riesgo que permite determinar el riesgo de desarrollar EIA, basado en todos los cambios genéticos relacionados con la enfermedad. Por lo tanto, el PRS puede ser una herramienta útil para predecir el riesgo de la enfermedad de manera que se puede mejorar la salud del paciente al acelerar el diagnóstico y poder pautarle un tratamiento adecuado (Duncan *et al.*, 2019).

No obstante, los resultados deben interpretarse teniendo en cuenta las limitaciones de GWAS y el PRS. Las estimaciones de GWAS pueden estar sesgadas debido al efecto causal del tamaño muestral, probablemente porque los rasgos asociados a un genotipo pueden estar relacionadas con el ambiente, lo que significa modulación epigenética. La investigación genética tiende a ignorar las influencias ambientales sobre el fenotipo, pero cada vez hay más pruebas que indican que la interacción genético-ambiental es un elemento clave que hay que tener en cuenta en etiopatogenia de la EIA. Sin controles para este sesgo, es muy difícil interpretar el riesgo poligénico como una medida del efecto de la genética (Selzam *et al.*, 2019)(Lee *et al.*, 2018). Además, el poder predictivo del PRS se atenúa cuando se extrapola a grupos étnicos distintos al del grupo de descubrimiento. Mientras que muchas poblaciones sigan estando infrarrepresentadas, la máxima utilidad del PRS se limitaría únicamente al grupo étnico estudiado (Pérez-Machado *et al.*, 2020). Por último, también se ha demostrado que a medida que aumenta el tamaño muestral, se identifican un mayor número de SNPs, por lo que los predictores poligénicos alcanzarían niveles importantes de poder predictivo (Lee *et al.*, 2018).

Siendo que la genética contribuye a predecir el riesgo de progresión de la EIA, e incluso a identificar la eficacia del tratamiento con el corsé (Giampietro, 2015) se ha postulado que los marcadores genéticos tienen el potencial para ser utilizados como factores pronósticos de la EIA (Geoffrey Burwell *et al.*, 2013). Sin embargo, hay escasos estudios sobre la asociación entre los SNP y la eficacia del tratamiento con corsé. En este sentido, Ogilvie y colaboradores mostraron que, a pesar de que la prueba pronóstica de EIA basada en SNPs desarrollada por su grupo, no estaba diseñada para predecir la respuesta al corsé, los rasgos genéticos subyacentes pueden proporcionar información sobre la respuesta de los pacientes a este tratamiento ortopédico(Ogilvie JW, Chettier R, Nelson LM, 2012). Xu y colaboradores demostraron que los pacientes con el alelo G del polimorfismo rs9340799 en el gen del receptor de estrógeno α (*ER α*) y el alelo A del polimorfismo rs10488682 del gen de la enzima triptófano hidroxilasa 1 (*TPH1*) son propensos a resistir el tratamiento con corsé. En el gen del receptor de la melatonina 1B (*MTNR1B*), la frecuencia del genotipo CC y el alelo C era también era mayor en los pacientes en los que fracasaba el tratamiento con el corsé. Estos autores concluyeron que los polimorfismos de los genes *ER α* y *TPH1* podían afectar significativamente al resultado final del tratamiento con corsé (Xu *et al.*, 2011).

Todo ello muestra la necesidad de estudiar el efecto que tiene el ambiente en el fenotipo de la enfermedad. Además, es importante tener en cuenta la validez y fiabilidad de los estudios comparativos entre poblaciones. Sólo si se interpretan las variaciones poligénicas dentro de las poblaciones estudiadas se obtendrá información que podrá ser utilizada en la clínica.

1.1.6. Epigenética. Mecanismos epigenéticos subyacentes a la EIA

La epigenética estudia los cambios en la actividad y la expresión de los genes que se producen sin alteración de la secuencia de ADN. Estos cambios están causados por la metilación del ADN, las modificaciones postraduccionales de las histonas y los ARN (ácido ribonucleico) no codificantes (ARN largos y microARNs). Adrian Bird definió la epigenética como “la adaptación estructural de las regiones cromosómicas para registrar, señalar o perpetuar estados de actividad alterados de los genes”(Bird, 2007). El entorno, la nutrición y el estilo de vida son algunos de los factores que pueden modular estos mecanismos. El papel de la epigenética en la progresión de la escoliosis ha ganado importancia desde que Burwell y colaboradores propusieron el papel del ambiente, el exposoma (cómo el entorno interactúa con el epigenoma) y la epigenética en la etiopatogenia de la EIA (Burwell *et al.*, 2011). Sin embargo, a día de hoy, es escasa la información que se conoce sobre los mecanismos y las rutas moleculares que subyacen a estos factores (Altaf *et al.*, 2013)(Newton Ede and Jones, 2016).

La coexistencia de un crecimiento óseo anormal y la baja densidad ósea en el contexto de la EIA sugiere una alteración del metabolismo óseo en la etiopatogenia de esta enfermedad. De hecho, recientemente se han dilucidado algunos mecanismos epigenéticos que regulan algunas de estas vías moleculares como la alteración de la homeostasis ósea, la desregulación de la diferenciación/proliferación de los osteoblastos y los osteoclastos, el aumento de la capacidad de la proliferación, así como la disminución de la capacidad de diferenciación osteogénica de las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (*Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*, BM-MSCs), entre otros (J. L. García-Giménez *et al.*, 2018).

1.1.6.1. Metilación del ADN en la EIA

Mao y colaboradores estudiaron el estado de metilación del promotor del gen *COMP*, el cual codifica para la proteína oligomérica de la matriz del cartílago. La hipermetilación del promotor de este gen se ha correlacionado con la gravedad de la curvatura en pacientes con EIA (Mao *et al.*, 2018). En dos pares de gemelos monocigóticos con distinta curva de progresión, Meng y colaboradores encontraron que la disminución de la metilación en el sitio cg01374129 se correlacionaba con la progresión de la curvatura en los pacientes con EIA (Meng *et al.*, 2018). Este sitio CpG está situado aproximadamente 1 Mb aguas abajo del gen *HAS2* (hialuronano sintasa 2). Es importante destacar que Has2 desempeña un papel crítico en el desarrollo de las vértebras y de los discos intervertebrales en ratones (Roughley *et al.*, 2011) y, curiosamente, se ha demostrado que la biosíntesis de ácido hialurónico se activa como resultado del aumento de expresión de *HAS2* tras la activación ruta Wnt/ β -catenina (Kim *et al.*, 2017). Meng y colaboradores evaluaron el estado de metilación de *HAS2* en sujetos diagnosticados con EIA. Los pacientes se dividieron en progresivos y no progresivos y se encontró que la hipometilación en cg01374129 era un factor pronóstico independiente para predecir la progresión y la gravedad de la curvatura de la columna con una sensibilidad (Sn) del 76,4% y una especificidad (Sp) del 85,6% y un área bajo la curva (AUC, siglas en inglés) =0,827; IC 95%: 0,780-0,876 (Tabla 5) (Meng *et al.*, 2018).

Shi y colaboradores analizaron en ADN obtenido de muestras de sangre de 50 pacientes con EIA y 50 controles sanos, el estado de metilación del promotor del gen *PITX1* (*pituitary homeobox 1*) (Shi *et al.*, 2018). El nivel medio de metilación determinado por técnicas de pirosecuenciación fue de $3,52 \pm 0,96\%$ en los sujetos con EIA y de $1,40 \pm 0,81\%$ en los controles sanos ($P < 0,0001$). Además, el análisis comparativo entre los grupos de EIA con metilación positiva y negativa, mostró diferencias estadísticamente significativas cuando se comparaba la edad ($P=0,021$) y el ángulo de Cobb de la curva principal ($P=0,0001$). Es importante destacar que, en pacientes con EIA, el nivel de metilación de seis sitios CpG en el promotor de *PITX1* se correlacionó positivamente con ángulos de Cobb $> 30^\circ$ ($P < 0,001$). Esto indica que la metilación de *PITX1* podría correlacionarse con la progresión de la curva y la gravedad de la misma (Shi *et al.*, 2018). Estos mismos autores estudiaron, en la misma cohorte de pacientes y mediante el mismo enfoque experimental, el estado de metilación y la expresión del gen *PCDH10*, que codifica para la proteína protocadherina 10, que presentaba niveles bajos en los pacientes con EIA. Encontraron un aumento significativo de la metilación en el grupo pacientes, niveles medios de metilación de $4,32 \pm 0,73$ respecto a los controles sanos, con niveles de metilación de $3,14 \pm 0,97$ ($P < 0,001$). Los resultados mostraron una correlación lineal estadísticamente significativa entre el nivel de metilación del gen *PCDH10* y el ángulo de Cobb de la curva mayor ($P < 0,001$) (Shi *et al.*, 2019).

Liu y colaboradores también estudiaron, en una pareja de gemelas monocigóticas con distinta curvatura, las diferencias de metilación del ADN utilizando la técnica de secuenciación de genoma completo con bisulfito (*Whole Genome Bisulfite Sequencing*, WGBS). El objetivo era identificar regiones diferencialmente metiladas (*Differential Methylated Regions*, DMRs). Se realizó un análisis de enriquecimiento de los genes asociados a DMRs para identificar las vías KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Los resultados mostraron un enriquecimiento de DMRs en genes asociados a diversas rutas biológicas. De estas, las tres con mayor significatividad fueron la vía de señalización MAPK, la vía de señalización PI3K-Akt y la vía de señalización Rap1, lo que indica que estas rutas pueden estar relacionadas con la EIA (Liu, Wang, *et al.*, 2019). Cabe destacar que Liu y colaboradores también demostraron que el gen *PAX1* estaba hipometilado en los pacientes con EIA. Este es un hallazgo importante porque los SNPs específicos en el gen de *PAX1* aumentan el riesgo de EIA (Liu, Wang, *et al.*, 2019), destacando una vez más la implicación de la ruta Wnt/ β -catenina en el desarrollo de esta enfermedad (Xu *et al.*, 2018)(Sivakamasundari *et al.*, 2017).

1.1.6.2. ARNs largos no codificantes en la EIA

Los ARN largos no codificantes (*long non-coding RNAs*, lncRNA) son transcritos de más de 200 nucleótidos que no contienen pautas de lectura funcionalmente activas y normalmente se ha conservado evolutivamente su función (Mercer, Dinger and Mattick, 2009). Estos ARNs tienen la capacidad de regular la expresión génica (Rinn and Chang, 2012)(Wapinski and Chang, 2011). Hasta la fecha, sólo unos pocos trabajos han explorado el papel de los lncRNAs en la EIA. Liu y colaboradores utilizando *microarray Agilent human lncRNA + mRNA Array V3.0* evaluaron, con muestras de ARN extraído de la sangre de cuatro pacientes con EIA y cuatro niños sanos, el perfil de expresión de lncRNA y mRNA. En este estudio, los autores identificaron 139 lncRNAs y 546 ARNm, los cuales se expresaron diferencialmente entre los dos grupos estudio (Liu *et al.*, 2015).

Además, los autores contextualizaron los resultados utilizando la herramienta *Gene Ontology* (GO) para determinar las rutas reguladas por estos lncRNAs. Los resultados mostraron que muchas de estas rutas estaban relacionadas con las vías de la mineralización ósea, la unión neuromuscular y la morfogénesis ósea, entre otras. Se encontraron cuatro lncRNAs diferencialmente expresados: ENST00000440778.1 que estaba infraexpresado; ENST00000602322.1, ENST00000414894.1 y TCONS_00028768, que estaban sobreexpresados en los pacientes respecto a los sujetos sanos, cuando se agrupaban según edad, altura, severidad de la enfermedad y Risser. De hecho, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de ENST00000602322.1 al comparar los pacientes que tienen desviación en una única región de la columna vertebral y aquellos que tienen dos ($P < 0,05$). Además, la expresión de ENST00000414894.1 era menor en los pacientes cuyo ángulo de Cobb $>40^\circ$ ($P < 0,05$), mientras que la expresión de ENST00000440778.1 era mayor en los pacientes con un grado de Risser ≤ 3 ($P < 0,05$) (Liu *et al.*, 2015).

En otro estudio llevado a cabo por Wang y colaboradores se midieron, a partir de muestras de sangre periférica en pacientes de sexo femenino con EIA y un grupo control, los niveles de expresión de lncRNAs y ARNm utilizando el *Agilent human lncRNA Array V3.0* (F. Wang *et al.*, 2016). Se encontraron 2116 lncRNAs y vieron que NONHSAT137367 era el lncRNA más infraexpresado (cambio de 11,3 veces) y mientras que NONHSAT103134 era lncRNA que más se sobreexpresaba (cambio de 5,2 veces) (F. Wang *et al.*, 2016).

Recientemente, Zhuang y colaboradores realizaron, con células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea de cinco donantes sanos y de 12 pacientes con EIA, un estudio de *microarray* en el que analizaron los lncRNAs de estas células. Se identificaron 1483 lncRNAs diferencialmente expresados en ambos grupos. Se centraron en el lncRNA más infraexpresado, ENST00000453347, el cual en las BM-MSC del grupo control, pero no en los pacientes EIA, interactuaba con NF90 para promover la estabilidad del ARNm de *HOXD8*. Esta interacción puede promover la transcripción de *RUNX2* (*Runt-related transcription factor 2*) (*master transcription modulator of osteoblast*) en las BM-MSC y conducir a la diferenciación osteogénica. Los niveles bajos de la expresión del lncRNA ENST00000453347 fueron confirmados por RT-qPCR (retrotranscripción o transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) en 30 pacientes con EIA y 20 controles sanos. De esta manera se demostró que esta infraexpresión en BM-MSCs está implicada en la patogénesis de la EIA (Zhuang *et al.*, 2019).

1.1.6.3. microARNs en la EIA

Los microARNs (miARNs) son pequeños ARNs no codificantes que regulan a nivel postranscripcional la expresión de los genes (Bartel, 2004). A través de este mecanismo, regulan el silenciamiento de la expresión génica y pueden modificar los programas transcripcionales en las células, así como el fenotipo de los organismos. La existencia de estos pequeños ARNs no codificantes, así como sus mecanismos de acción no son descubrimientos recientes, sin embargo, las implicaciones clínicas son relativamente nuevas y siguen siendo objeto de debate. Los miARNs pueden actuar intracelularmente o ser secretados activamente por las células y contribuir a la comunicación intercelular o entre células y tejidos (Bartel, 2004). Los miARNs son

notablemente estables en los fluidos biológicos humanos (Weber *et al.*, 2010), incluidos el plasma y el suero, debido a su empaquetamiento en vesículas, como los exosomas, las microvesículas y los cuerpos apoptóticos. También pueden estar unidos a proteínas de unión al ARN, como las pertenecientes a la familia Argonauta (Argo2) o complejos lipoproteicos como la lipoproteína de alta densidad (HDL) (Boon and Vickers, 2013). Como resultado, los miARNs circulantes son potentes biomarcadores de diagnóstico y pronóstico en diferentes enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiovasculares o enfermedades hepáticas (Allegra *et al.*, 2012)(Sayed and Abdellatif, 2011)(Szabo and Bala, 2013) y condiciones fisiopatológicas como la inflamación. En concreto, se ha demostrado que los miARNs participan en el control del metabolismo óseo y la homeostasis, y regulan la diferenciación de los osteoblastos y la formación de osteoclastos (Lian *et al.*, 2012). De este modo, los miARNs pueden participar en el control de rutas moleculares implicadas en los trastornos relacionados con el hueso (Lian *et al.*, 2012)(Arfat *et al.*, 2015)(Meng *et al.*, 2018)(Zhang *et al.*, 2018)(Tabla 5).

Por tanto, no es sorprendente que los miARNs también puedan controlar los mecanismos moleculares subyacentes a la etiología de la EIA. Zhang y colaboradores estudiaron el papel de estos pequeños ARNs en la EIA. Estos autores aislaron osteoblastos primarios de biopsias óseas de pacientes con EIA (obtenidas de autoinjerto de hueso ilíaco tras una intervención de fusión ósea) y de controles (obtenidos de hueso esponjoso tomadas durante la cirugía). Se buscaron en estas muestras aquellos miARNs implicados en la regulación de los osteoblastos y osteocitos (Zhang *et al.*, 2018). Estos autores demostraron el papel de miR-145/ β -catenina en la función de los osteocitos en la EIA, ya que la *down*-regulación del miR-145 en los osteoblastos en pacientes con EIA puede parcialmente recuperar la función de los osteocitos. El miR-145 y la β -catenina están sobreexpresados en los tejidos óseos y en los osteoblastos primarios, y su expresión se correlaciona positivamente con la EIA. Además, también se encontró, a partir de muestras de suero de pacientes EIA, una correlación significativa de signo negativo entre miR-145 circulante y la esclerostina, osteopontina y osteoprotegerina. Esto sugiere el potencial uso del miR-145 como biomarcador de la progresión de esta enfermedad (Zhang *et al.*, 2018) (tabla 5).

El grupo de Li y colaboradores investigaron si la osificación endocondral en las últimas etapas de la degeneración del disco estaba afectada por la expresión de los miARNs para controlar la diferenciación osteogénica en el anillo fibroso. Estos autores confirmaron que la sobreexpresión de miR-221 suprimía el potencial osteogénico a través de la regulación postraduccional de las rutas BMP2-Smad. Yeh y colaboradores observaron, en células obtenidas del anillo fibroso de pacientes con EIA (de 13 a 16 años) y de pacientes adultos (de 48 a 65 años) con escoliosis degenerativa, una disminución en la expresión del miR-221 (Yeh *et al.*, 2016). Más recientemente, Penolazzi y colaboradores también estudiaron el papel del miR-221 como un factor anti-condrogénico implicado en la degeneración del disco intervertebral. Estos autores mostraron que al utilizar el antago-miR-221 se producía un aumento significativo de la expresión de los marcadores condrogénicos típicos (es decir, *COL2A1*, *ACAN* y *SOX9*), cuya pérdida se asocia a la degeneración del disco intervertebral, restableciéndose la expresión de *FOXO3* y aumentando la expresión de *TRPS1*, disminuyendo, por tanto, el grado de severidad de la degeneración del disco intervertebral (Penolazzi *et al.*, 2018). Otro miARN relacionado con la degeneración del disco intervertebral es el miR-21, ya que este miARN puede inhibir la

traducción del ARNm del gen *PTEN* (Xiong *et al.*, 2013) y estimular la ruta de señalización de AKT, contribuyendo de este modo a la proliferación anormal de las células del núcleo pulposo (Liu *et al.*, 2014).

Las células madre mesenquimales (MSCs), con potencial de diferenciación osteoblastogénica y adipogénica, desempeñan un papel fundamental en la homeostasis de la masa ósea en la EIA (Park *et al.*, 2009). Recientemente, Hui y colaboradores realizaron un estudio con el objetivo de identificar los miARNs que regulan las vías de la diferenciación osteoblástica en las MSCs en pacientes con EIA (Hui *et al.*, 2019). Estos autores identificaron siete miARNs, miR-17-5p, miR-106a-5p, miR-106b-5p, miR-16-5p, miR-93-5p, miR-15a-5p y miR-181b-5p, implicados en la señalización de la ruta PI3K/Akt en las MSC. Estos miARNs pueden jugar un importante papel en la formación y la maduración ósea de los pacientes con esta enfermedad (Hui *et al.*, 2019).

Cuando se estudiaron los miARNs circulantes en plasma de pacientes de EIA mediante *smallRNA-seq* (secuenciación de ARNs pequeños) se identificó una firma de miARNs circulantes diferencialmente expresados en pacientes con EIA respecto a sujetos sanos (miR-122-5p, miR-27a-5p, miR-223-5p, miR-1306-3p, miR-671-5p) (J. L. García-Giménez *et al.*, 2018) (Tabla 5). Continuando con el papel de estos miARNs en la EIA, se ha visto que estos pequeños ARNs regulan la expresión de los genes implicados en la ruta de señalización Wnt/ β -catenina. En concreto, el miR-122-5p suprime la activación de la vía Wnt/ β -catenina, como ya demostraron Wang y colaboradores (G, Y and Y, 2014). Esta vía es la ruta clásica de diferenciación de los osteoblastos, en la que la activación de la β -catenina promueve el compromiso de los osteoblastos a partir de las células madre mesenquimales estimulando la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, y evitando la osteoclastogénesis, así como la apoptosis de osteoblastos y osteocitos (Almeida *et al.*, 2005). La proteína APC (*tumour suppressor adenomatous polyposis coli protein*) también participa en la ruta Wnt, la cual acerca la β -catenina a la enzima glucógeno sintasa quinasa 3B (*glycogen synthase kinase 3B*, GSK3B) lo cual provoca la fosforilación de la β -catenina y su degradación por el proteasoma. La fosforilación de la β -catenina impide su migración al núcleo, que a su vez conduce a la reducción de la formación del hueso y al aumento de la reabsorción del hueso (Baron and Kneissel, 2013). Se ha descrito que el miR-27a-5p inhibe la expresión del gen que codifica para la proteína APC al activar la migración de la β -catenina al núcleo, de este modo se activa la diferenciación de los osteoblastos. Los niveles de expresión del miR-27a se correlacionan positivamente con la β -catenina (Wang and Xu, 2010). La importancia de este miARN es debida a que con la herramienta *TargetScan Human 6.2* se identificaron hasta 21 posibles dianas que se encuentran relacionadas con 23 sitios de unión conservados de genes que participan en la ruta Wnt/ β -catenina. La diferenciación de los osteoblastos también se promueve gracias a la participación de proteínas morfogénicas óseas, como BMP-2, BMP-4 (Abe *et al.*, 2000)(Kang *et al.*, 2009), y en menor medida por BMP-8 (Kang *et al.*, 2009), y sus receptores BMPR1A y BMPR2. La herramienta DIANA-miRPath v3.0 identificó que BMP y BMPR son dianas del miR-27a-5p. Así pues, este miARN inhibe drásticamente la osteogénesis al reprimir la señalización mediada por BMP y SMAD (Gong *et al.*, 2014).

Continuando con estos miARNs, el miR-223-5p interactúa con el gen que codifica para el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2). Este factor regula positivamente la diferenciación de

los osteoblastos y la formación de hueso a través de la vía Wnt/ β -catenina (Fei *et al.*, 2011). Este factor es necesario para que se acumule BMP2 en el núcleo y que este colocalice con los transductores fosfo-Smads1/5/8 y el factor 2 de transcripción relacionado con Runt 2 (Runx) (Agas *et al.*, 2013), traduciendo la señal en formación de hueso. El gen *PCGF3* (también llamado *BMI1*) es diana del miR-223-5p. Este gen está implicado en la autorenovación de las células madre mesenquimales de la médula ósea, y juega un papel fundamental promoviendo la osteogénesis. De hecho, ratones *knock-out* para *BMI1* muestran un retraso en el desarrollo del esqueleto óseo, una disminución de la proliferación de los condrocitos y un aumento de la apoptosis (Zhang *et al.*, 2010). El miR-223-5p puede regular la osteoclastogénesis al disminuir la expresión de genes específicos de los osteoclastos *PU.1*, *RANKL*, *NFATc1*, *TRAP*, *c-Jun*, cathepsina K (Sugatani and Hruska, 2007).

Además, en el análisis de rutas se vio que el miR-671-5p interactúa con SMAD3 y SMAD4, los cuales participan en la transcripción de Runx2 dependiente de Smad, que es fundamental para la transcripción de genes específicos de los osteoblastos (e.g. Runx2, Dlx5 and Sp7/Osterix) y de la formación del esqueleto óseo (Chen, Deng and Li, 2012). Asimismo, el análisis con *TargetScan* permitió a García Giménez y colaboradores identificar que este miARN también interactúa con los transcritos de BMPR2, BMP8A y BMP8B (J. L. García-Giménez *et al.*, 2018). Anteriormente ya se había descrito en la literatura que este miARN interacciona con BMPR2 (Wang *et al.*, 2012). Con otras herramientas bioinformáticas estos autores también describieron que este miARN tiene como diana a Smad3, el cual es un factor crítico en la ruta de señalización TGF β que juega un papel fundamental en la formación del hueso (J. L. García-Giménez *et al.*, 2018). De hecho, la sobreexpresión de Smad3 aumenta los niveles de Runx2, también conocido como CBF α -1 (*core-binding factor subunit alpha-1*), de Sp7/Osterix y de β -catenina, que son factores de transcripción muy importantes implicados en la diferenciación de los osteocitos. Estos regulan o bien la diferenciación de las células mesenquimales o de las células estromales de la médula ósea para dar lugar a los osteoblastos (Karsenty, Kronenberg and Settembre, 2009)(Komori, 2006).

Finalmente, estos mismos autores describieron que el miR-1306-3p, tiene como diana el gen que codifica para la proteína PP2CB (*protein-serine/threonine phosphatase 2CB*), que participa en la vía de señalización de TGF β (J. L. García-Giménez *et al.*, 2018). Este miARN también se une al gen que codifica para Rac2, implicado en la ruta Wnt. Se trata de una Rho GTPasa en los osteoclastos maduros, esencial para la quimiotaxis y la actividad de reabsorción (Itokowa *et al.*, 2011). Por último, este miARN tiene como diana el gen que codifica para la proteína morfogénica ósea 1 (*BMP1, bone morphogenic protein 1*), implicada en el crecimiento del hueso y del cartílago (Tabas *et al.*, 1991).

Para esclarecer aún más las vías moleculares en las que participan estos miARNs candidatos a conformar el kit ScoliPro[®], se realiza un análisis de sobrerrepresentación (*over-representation analysis*, ORA) de los genes diana diferencialmente expresados entre pacientes EIA y controles, y así, poder detectar el enriquecimiento de genes en categorías biológicas. Entre las diferentes rutas identificadas en la base de datos KEGG obtenidas por ORA, se encontraron varias vías que pueden estar estrechamente relacionadas con la EIA. Por ejemplo, los resultados mostraron que los genes incluidos en la vía de señalización de FOXO (*forkhead box O*) están sobreexpresados como resultado de la expresión diferencial de la firma miARNs miR-122-5p, miR-27a-5p, miR-

223-5p, miR-1306-3p, miR-671-5p. La ruta FOXO parece estar relacionada con la EIA, ya que se ha demostrado que la adiponectina regula la masa ósea a través de mecanismos centrales y periféricos opuestos a través de FoxO1. Curiosamente, Zhang y colaboradores han demostrado recientemente que la adiponectina tiene un efecto negativo sobre el metabolismo óseo en pacientes con EIA (Zhang *et al.*, 2019).

Además de la ruta FOXO y otras como la PI3K-Akt, diana de rapamicina en mamíferos (mTOR), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y las vías de señalización Wnt, se ha visto en el análisis bioinformático de transcriptoma completo de muestras de pacientes, que la deficiencia en vitamina A está relacionada con la escoliosis congénita (C. Chen *et al.*, 2018). Otra vía identificada por ORA fue la de los proteoglicanos en cáncer, lo cual sugiere que este grupo de glucoproteínas puede estar asociado con la EIA. De hecho, al investigar la expresión de los genes implicados en el crecimiento de los discos vertebrales, extirpados durante la cirugía de la columna vertebral en pacientes con EIA, Zaydman y colaboradores descubrieron que los genes que controlan la sulfatación de la condroitín sulfato podrían ser agentes causales de la deformidad de la columna vertebral (Zaydman *et al.*, 2019). La ruta de señalización de Rap1 también se identificó en el análisis de enriquecimiento de los genes que son regulados por los miARNs. Este resultado es importante porque también fue descrito por Liu y colaboradores en un estudio de metilación del ADN, tal como se ha descrito anteriormente (Liu, Wang, *et al.*, 2019). Así pues, Rap1 adquiere importancia en la EIA. Probablemente Rap1 es fundamental para la función de los osteoclastos (Zou *et al.*, 2013) y está estrechamente relacionado con la vía de señalización Wnt/ β -catenina. Otra ruta de señalización identificada bioinformáticamente fue la vía de señalización endocrina. Este resultado es debido a que genes que codifican para los receptores de estrógeno, como el ER α y el ER β , participan en esta ruta y en otras como Notch, PI3KAkt y la vía de señalización del AMPc. Además, la ruta de señalización PI3K-Akt está estrechamente relacionada con la vía de señalización Wnt. De hecho, se ha descrito que la inhibición farmacológica de la actividad de PI3K reduce la diferenciación de los osteoblastos y suprime la expresión de los genes que regulan la ruta Wnt (Saidak *et al.*, 2015). Todas estas vías han sido descritas previamente en la EIA (Liu, Wang, *et al.*, 2019)(Zhuang *et al.*, 2016). Concretamente genes como el *Era* están estrechamente relacionados con esta enfermedad (Inoue *et al.*, 2002)(Janusz *et al.*, 2014)(Kotwicki *et al.*, 2014).

Por último, también se ha estudiado la vía de señalización de las uniones adherentes (*adherence junction*) tras identificar el papel de *SUFU* (*suppressor of the fused homolog*) y *AJAP1* (*adherens junctions associated protein 1*) en un análisis de exoma en pacientes con EIA (Oliazadeh *et al.*, 2017). Mediante estudios de linaje, ambos genes han sido relacionados con la escoliosis idiopática (Zhu *et al.*, 2015)(Marosy *et al.*, 2010). En concreto, el SNP rs241215 en el gen *AJAP1* se ha asociado con la EIA (Zhu *et al.*, 2015)(L. Xu *et al.*, 2019)(Man *et al.*, 2019).

Esta descripción detallada de las rutas de señalización muestra el papel fundamental que ejercen los miARNs en la regulación de la señalización durante la diferenciación osteoblasto/osteoclasto en pacientes con EIA. Los resultados descritos por Zhang y colaboradores (Zhang *et al.*, 2018) así como los obtenidos por García-Giménez y colaboradores (J. L. García-Giménez *et al.*, 2018) muestran la importancia de los miARNs (miR-221, miR-122-5p, miR-27a-5p y miR-145) que controlan la vía de señalización Wnt/ β -catenina. Siendo esta una prometedora diana sobre la

cual desarrollar futuras estrategias terapéuticas. Además, otros investigadores como Hayes y colaboradores (Hayes *et al.*, 2014) y Chen y colaboradores (C. Chen *et al.*, 2018) también han encontrado que esta vía de señalización está desregulada en pacientes con EIA. De hecho, otros genes como *BMP2* y *RUNX2* participan en varias rutas interconectadas, también descritas anteriormente, que conducen a la osteoblastogénesis y a la formación de hueso (Zhang *et al.*, 2002) y que pueden estar reguladas por miARNs en pacientes con EIA (J. L. García-Giménez *et al.*, 2018)(Yeh *et al.*, 2016).

1.1.7. Potencial uso de los biomarcadores epigenéticos en el manejo de la EIA

A pesar de los esfuerzos realizados, todavía sigue siendo un reto el identificar biomarcadores de diagnóstico precoz de la EIA y poder realizar un pronóstico de la progresión de la columna, así como predecir la respuesta de los pacientes al tratamiento conservativo con corsé. En la actualidad, la investigación se centra en las variantes genéticas que contribuyen a la aparición de la enfermedad y en la identificación de marcadores epigenéticos que contribuyen a la progresión de esta con el fin de proporcionar posibles biomarcadores y mejorar el manejo de la enfermedad y el tratamiento clínico. La epigenética puede mejorar la medicina de precisión al identificar nuevos mecanismos de regulación y proporcionar nuevos biomarcadores, dianas terapéuticas y fármacos con potencial uso clínico, especialmente en las enfermedades humanas multifactoriales. Para un determinado fenotipo, hay una contribución causal de las mutaciones genéticas, de la variación en el número de copias, de la epigenética, de la alteración del mecanismo de transcripción y de las aportaciones del metabolismo (Beltrán-García *et al.*, 2019). En entornos biológicos complejos, los biomarcadores epigenéticos pueden ayudar al diagnóstico precoz, a la monitorización de la enfermedad y evaluación del pronóstico, así como a la identificación y estratificación de los pacientes según el riesgo de progresión. Además, es importante destacar que los biomarcadores epigenéticos pueden identificar a los pacientes que responden positiva o negativamente a las intervenciones terapéuticas.

En la Tabla 5 se muestran los candidatos más factibles a convertirse en biomarcadores epigenéticos de la EIA. Curiosamente estos biomarcadores están estrechamente relacionados con la vía de señalización Wnt/ β -catenina. El hecho de que esta ruta también esté relacionada con genes como *TNIK*, *MAGI1* y *MEIS1*, cuyos SNPs también fueron identificados por GWAS (Tabla 4), resalta el papel de esta ruta en la etiología de la EIA, siendo esta vía de señalización candidata para el diseño de una futura terapia dirigida.

Otros estudios epigenéticos, como las modificaciones de las histonas y accesibilidad a la cromatina, en combinación con otras "ómicas" como el *RNAseq* (secuenciación del ARN) y el análisis proteómico podrían esclarecer la etiopatogenia de la EIA. Una aproximación o enfoque multi "-ómico" parece ser necesario para cumplir el objetivo final de desarrollar un test preciso, con función pronóstica de la EIA y poder desarrollar futuras estrategias terapéuticas.

En concreto el desarrollo de un test basado en biomarcadores epigenéticos para evaluar el pronóstico de la EIA proporcionaría numerosas ventajas. Por un lado, permitiría reducir el gasto sanitario ya que solo se tratarían aquellos pacientes cuyas curvas tienen riesgo de progresión. Además, acortaría los casos que conllevan monitorización de rayos X para su seguimiento, es decir, únicamente se seguirían en consulta del especialista de forma más continua aquellos

pacientes que tengan un riesgo alto de progresión, reduciendo sustancialmente la exposición a la radiación. Por otro lado, se facilitaría el sistema de cribado priorizando la derivación a los especialistas sólo de aquellos pacientes que tuviesen riesgo de padecer una EIA progresiva. En esta misma línea, el desarrollo de un test para el pronóstico de la EIA permitiría establecer un tratamiento personalizado a cada uno de los pacientes, de tal manera que se podría realizar una cirugía “precoz” a los pacientes con curvas de elevado riesgo de progresión y pautar el uso del corsé únicamente en aquellos pacientes con riesgo de progresar menos severamente, así como realizar un seguimiento observatorio en el caso de pacientes con curvas no progresivas.

Por tanto, el desarrollo de este test sería una aproximación a la medicina de precisión, en la cual se potencia cada vez más el uso de los biomarcadores epigenéticos en entornos clínicos. De hecho, La Medicina de Precisión fue definida por el *National Research Council's toward Precision Medicine* como: “La adaptación del tratamiento médico a las características individuales de cada paciente... para clasificarlos en subpoblaciones en base a su susceptibilidad a una determinada enfermedad o a su respuesta a un tratamiento específico. Las intervenciones preventivas o terapéuticas podrían aplicarse solamente a aquellos pacientes que se beneficiarán, disminuyendo los gastos y los efectos secundarios en estos pacientes en los que no la intervención no tiene ningún efecto" (Ginsburg and Phillips, 2018).

Tabla 5. Biomarcadores epigenéticos relacionados con EIA.

Biomarcador epigenético	Biospecimen	Rutas moleculares	Sensibilidad/especificidad	Referencia bibliográfica
Metilación del ADN de HAS2 en el sitio cg01374129	ADN obtenido de linfocitos de sangre periférica	Señalización Wnt/ β -catenina	Sn: 76.4%, Sp: 85.6% (AUC=0.827; 95%CI: 0.780–0.876)	(Meng <i>et al.</i> , 2018)
miR-122-5p miR-27a-5p miR-223-5p miR-1306-3p	Plasma	Wnt/ β -catenina; PI3K-Akt; mTOR; EGFR; Rap1	Sn: 92.9% Sp: 72.7% (AUC=0.95; 95%CI: 0.89–1.00)	(J. García-Giménez <i>et al.</i> , 2018)
miR-145	Suero	Señalización ruta Wnt/ β -catenina	Sn 72,7% Sp 90% (AUC=0.93; 95% CI: 0.88–0.98)	(Zhang <i>et al.</i> , 2020a)

1.2. Técnicas de detección de miARNs maduros

1.2.1. Tecnologías de alto rendimiento

1.2.1.1. Microarrays

Se trata una técnica rápida, muy utilizada para estudiar el perfil de microARNs ya que permite el *screening* simultáneo de un número elevado de estos pequeños ARNs. Durante los últimos años se han desarrollado muchas variantes de micromatrices, en las que se ha modificado el diseño de las sondas, el método de inmovilización de éstas, el marcaje de la muestra y los métodos para la detección de la señal. El fundamento de esta técnica se basa en la hibridación de los ácidos nucleicos con su correspondiente sonda que está incluida en un soporte o matriz. El proceso implica el aislamiento de los microARNs que posteriormente se hibridan con una sonda específica impresa sobre una superficie, el *microarray*. La detección del marcaje de los miARNs puede ser de forma directa o indirecta. Los distintos tipos y el nivel de expresión de los miARNs presentes en la muestra de estudio se evalúan en base a la intensidad de señal (Li and Ruan, 2009)(Hunt *et al.*, 2015). Existen varios métodos de detección: (1) aquellos con un extremo *hairpin* en 5' que favorecen la selección únicamente del miARN maduro, (2) SHUT (*stacking-hybridized universal tag*) se trata de una sonda universal la cual se estabiliza una vez se une el miARN, (3) el método que utiliza la unión de PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille)-dsRBD en el cual se reconoce el extremo 3' y el miARN hibrida formando una estructura de doble cadena, y finalmente, (4) el ensayo LAHS (*ligase-assisted sandwich hybridization*), se trata de un método sin etiqueta que utiliza la unión adyacente de la sonda y la sonda con horquilla marcada para facilitar la unión (Hunt *et al.*, 2015).

Algunas de las limitaciones de esta técnica es que se trata de un método semicuantitativo siendo más adecuado para la comparación de los niveles de expresión de miARNs entre distintos estados, por ejemplo, entre un grupo control sano y grupo enfermo. Por consiguiente, requiere otro método de validación para cuantificar los niveles de expresión, como puede ser la RT-qPCR. Además, cabe tener en cuenta que el *microarray* tiene un rango dinámico menor que otros métodos de detección como la RT-qPCR o la técnica de NGS (*Next-Generation Sequencing*). También, al tratarse de un método basado en hibridación, pueden resultar problemas de especificidad entre secuencias similares. Finalmente, el *microarray* únicamente contiene las sondas que se actualizan en cada versión del ensayo, ello implica que aparecerán representados en el array los miARNs que se han descrito hasta ese momento. Sin embargo, se han realizado nuevos avances y modificaciones con el objetivo de resolver estas limitaciones (Hunt *et al.*, 2015). Es muy importante, por tanto, en el análisis de *microarray* de miARN emplear un método o técnica de detección específico, como por ejemplo fluorescencia, quimioluminiscencia, basada en nanopartículas y electroquímica, etc. (Cheng *et al.*, 2018).

Finalmente, en los últimos años también se han realizado variaciones en esta técnica, principalmente del diseño de la sonda, la química de inmovilización, marcaje de la muestra y los métodos de detección de la señal de los chips de *microarrays* (Liu *et al.*, 2008)(Alhasan *et al.*, 2012)(Ueno and Funatsu, 2014).

1.2.1.2. Secuenciación de última generación; NGS

Este método, también llamado secuenciación de segunda generación, es el más utilizado para el análisis de expresión de microARNs debido a la gran cantidad de información que proporciona, permitiendo detectar miARNs desconocidos, isoformas e identificar de forma masiva y en paralelo nuevos biomarcadores. El nivel de precisión de esta técnica es muy elevado, llegando a alcanzar el 99,99%.

De forma resumida, el procedimiento de esta técnica se basa en la preparación de la librería para la muestra de ARN de interés, seguida de la secuenciación masiva en paralelo de millones de moléculas de ADNc. Posteriormente, se realiza el análisis bioinformático de las lecturas de las secuencias, el cual proporciona una cuantificación relativa de la expresión de los miARNs utilizando un enfoque digital (De Planell-Saguer and Rodicio, 2013).

Las tecnologías de secuenciación se agrupan en base a grandes rasgos como son preparación de las muestras, la secuenciación e imagen y el análisis de datos. Todas ellas tienen en común que la secuenciación se lleva a cabo por síntesis y aplican los pasos citados anteriormente. La combinación única de protocolos específicos es la que distingue una tecnología de otra y determina el tipo de datos producidos en cada plataforma. Hay que tener en cuenta que el método NGS no está limitado a las secuencias previamente registradas en miRBase (como es el caso de los *microarrays* o la RT-qPCR), y aunque esto significa que se pueden descubrir nuevas secuencias de miARNs, no todas las lecturas de ARN pequeño obtenidas serán un miARN funcional (Hunt *et al.*, 2015).

Se trata de una técnica de elevado coste y tiempo por lo que de momento no es útil como técnica rutinaria en la práctica clínica. Además, otras limitaciones son la infraestructura informática necesaria para el análisis, la complejidad que supone el análisis de la gran cantidad de datos que se generan así como la interpretación de los mismos (Ouyang *et al.*, 2019)(Hunt *et al.*, 2015)(De Planell-Saguer and Rodicio, 2013). Además, cabe tener en cuenta los problemas de sesgo en la PCR que surgen durante la preparación de la librería o la secuenciación. Los fragmentos con alto contenido en GC y estructuras secundarias tienen menos probabilidades de ser amplificados en el mismo sistema. Finalmente, cabe tener en cuenta que en los resultados de la secuenciación de determinados fragmentos, es difícil identificar si el número de repeticiones es el reflejo real de la muestra en sí o la desviación causada por la PCR (Ouyang *et al.*, 2019).

Por otro lado, por lo que respecta a las tecnologías de secuenciación de tercera y cuarta generación no requieren de amplificación por PCR. Se caracterizan por un mayor rendimiento, mayor precisión, menor tiempo de secuenciación y menor coste. Incluyen principalmente la secuenciación única y verdadera (*true single molecular sequencing, Tsms*), secuenciación de una sola molécula en tiempo real (*single molecule real-time sequencing, SMAT*), transferencia de energía fluorescente por resonancia (*fluorescence resonance energy transfer, FRET*) y secuenciación de moléculas individuales por la tecnología de nanoporos (NanoString, Reino Unido). Las tecnologías de tercera generación se utilizan principalmente para la secuenciación del genoma completo, la secuenciación de genes dirigidos y la secuenciación del ARNm de

longitud completa, etc. (Kumar, Cowley and Davis, 2019). No obstante, en la actualidad, la mejor opción para secuenciación sigue siendo el sistema de segunda generación (Liu *et al.*, 2020).

1.2.2. Técnicas de amplificación

1.2.2.1. RT-qPCR

La RT-qPCR implica dos pasos. En primer lugar la RT (retrotranscripción o transcripción inversa), en el que el miARN diana, por la actividad de la transcriptasa inversa, se retrotranscribe a ADNc. En segundo lugar, este ADNc sirve como plantilla para ser amplificado con unos cebadores en la qPCR para lo cual se utiliza además un fluorocromo, lo que conlleva la emisión de fluorescencia durante los ciclos de amplificación. Existe una relación lineal entre el valor de Ct (*threshold value*) y el logaritmo de la cantidad de *template*, es decir, a menor Ct, mayor cantidad de *template* y viceversa (Liu *et al.*, 2020).

La PCR en tiempo real se ha convertido en una técnica rutinaria y fiable para la detección de la expresión de miARNs debido a su amplio rango dinámico y alta sensibilidad. De hecho, está considerada como la técnica *gold standard* para la detección de miARNs, utilizándose además, como método de validación de los resultados obtenidos con técnicas de alto rendimiento (Ye *et al.*, 2019)(Roberts, Coenen-Stass and Wood, 2014)(De Planell-Saguer and Rodicio, 2013).

Se trata de una técnica mucho más sensible, hasta 1000 veces mayor que otros métodos basados en hibridación, pudiéndose detectar un número bajo de copias del miARN diana. Aunque se trata de un método bien establecido, el problema de esta técnica es que, puesto que se necesita un grado alto de pureza, se desperdicia mucha muestra siendo engorroso el procedimiento experimental de purificación de miARNs. Además, cabe tener en cuenta que se trata de un método cuantitativo que no permite la identificación de nuevos miARNs (Ouyang *et al.*, 2019). Finalmente, es importante considerar que la corta longitud de estas biomoléculas dificulta el diseño de cebadores para la RT y la PCR (Liu *et al.*, 2020).

En la práctica clínica, la RT-qPCR ofrece la posibilidad de cuantificar los miARNs en ensayos de diagnóstico precoz, para seguir la progresión de la enfermedad, la clasificación del tipo de cáncer, el cribado de genes de ARN responsables de enfermedades y el seguimiento de la eficacia de los tratamientos (Yong and Dutta, 2009)(Murphy and Bustin, 2009).

1.2.2.2. PCR digital en gotas (*droplet digital PCR*, ddPCR)

La PCR digital en gotas constituye la tercera generación de PCR, la cual fue desarrollada en el año 2011. Permite una cuantificación absoluta del ácido nucleico en estudio al generar la división de los reactivos en conjunto con la muestra en 1000 nanogotas/ μL (en total 20.000 gotas/muestra). Las moléculas del ADN se distribuyen de forma aleatoria de manera que algunas gotas contendrán una o más copias del ADNc y otras no contendrán ninguna copia. Las gotas no interactúan entre sí por lo que el resultado es reflejo de la situación que se genera con la

partición en nanogotas. Tras una reacción de PCR convencional, se cuantifican las gotas positivas y negativas mediante la medición de la fluorescencia de cada producto de PCR. Para ello, las gotas pasan por el detector óptico de una en una (en una fila única), el cual mide la fluorescencia de forma individual y la convierte en una señal digital. El *software* mide en cada muestra el número de gotas positivas y negativas para cada fluoróforo. Las gotas positivas son las que contienen al menos una copia de la molécula en estudio y presentan un incremento de fluorescencia respecto a las negativas. Después, la fracción de gotas positivas se ajusta a un algoritmo de *Poisson* para determinar la concentración inicial de la molécula en estudio en unidades de copias/ μL de muestra (*Droplet Digital™ PCR Droplet Digital™ PCR Applications Guide*, no date).

La ddPCR tiene varias aplicaciones entre ellas la cuantificación absoluta de la molécula diana (cuantificación de microorganismos y análisis de carga viral), el estudio del número copias de alteraciones genómicas del rango de diferencias de 1,2x que no se pueden detectar por otras metodologías, la detección de secuencias o mutaciones raras (células tumorales poco abundantes en un *background wild-type*), la cuantificación de las librerías de NGS para aumentar la exactitud de la secuenciación y validación de los resultados obtenidos en la secuenciación en SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) o CSV (*Copy Number Variations*), así como la detección de edición genómica, es decir, permite una evaluación rápida, precisa y eficiente de HDR (*Homology Directed Repair*) y NHEJ (*Non-Homologous End Joining*) generados por CRISPR/Cas9 y otras herramientas de edición del genoma. Además, también se puede utilizar para el análisis en célula única: el alto grado (10-100 veces) de variación célula-célula en la expresión génica y el contenido genómico entre poblaciones homogéneas de células madre, progenitoras y post mitóticas genera la necesidad de análisis de células individuales (*Droplet Digital™ PCR Droplet Digital™ PCR Applications Guide*, no date).

Finalmente, se puede utilizar para el análisis de expresión génica de bajo nivel y miARNs. De hecho permite la cuantificación absoluta de los miARNs circulantes en plasma evitando los problemas relacionados con su baja concentración y la normalización (Ferracin and Negrini, 2018). Además, la precisión y reproducibilidad de la ddPCR la sitúa como la técnica de elección en los estudios de miARNs como biomarcadores no invasivos prometedores en múltiples enfermedades y en diferentes contextos clínicos (Giraldez, Chevillet and Tewari, 2018).

1.2.2.3. Otras técnicas de amplificación

1.2.2.3.a. Métodos basados en RCA (*rolling circle amplification*)

La corta longitud de los miARNs es adecuada para ser utilizados como *template* en las sondas circulares “candado” que, junto con una ligasa específica, permite la detección de los miARNs con una elevada especificidad. Por tanto, el propio miARN puede actuar directamente como cebador para el inicio de la reacción (Jonstrup, Koch and Kjems, 2006)(Cheng *et al.*, 2009). La característica de esta técnica es que el producto de la reacción puede extenderse teóricamente de forma infinita, de manera que el resultado son repeticiones en tándem del miARN complementarias a la sonda circular. Se trata por tanto de una técnica analítica muy sensible para la amplificación de la señal a temperatura constante (Liu *et al.*, 2020). Es importante

destacar que existen varios métodos de detección para este tipo de amplificación, desde técnicas de fluorescencia, colorimetría, hasta electroquímica, electroquimioluminiscencia, etc. Esta técnica es cada vez más habitual en la detección de miARNs al permitir la obtención de imágenes *in vivo* e *in vitro*, ya que el producto de RCA se ancla al miARN diana pudiendo colocalizarlo a través de la señal (Cheng et al., 2018). De hecho, la técnica TIRCA (*toehold-initiated rolling circle amplification*) basada en RCA permite la visualización de los miARNs *in situ* en las células. Se trata de un método competitivo en la obtención de imágenes de miARNs que puede proporcionar información sobre la implicación y regulación de los miARNs en las enfermedades humanas (Deng et al., 2014).

Finalmente, Ge y colaboradores describieron la estrategia RCA *target-primed* (TPRCA) la cual también permite la visualización *in situ* de los patrones de expresión de los miARNs en las células. Se trata de una técnica con alta sensibilidad y especificidad, que a diferencia de la técnica *In situ hybridation* (ISH) elimina las interferencias producidas por los precursores de los miARNs y ARNm (J. Ge et al., 2014).

1.2.2.3.b. Métodos basados en reacción en cadena de la ligasa (*ligase chain reaction*, LCR)

Esta técnica utiliza dos pares de sondas adyacentes que son complementarias al miARN de interés. Una ligasa específica une estas dos sondas para formar una única cadena, la cual sirve como molde para la unión de otro par de sondas adyacentes en los sucesivos ciclos de amplificación, amplificación exponencial. Debido a la alta eficiencia de la ligasa termoestable, esta técnica muestra mayor especificidad que la amplificación a partir de la extensión de los cebadores, como es el caso de la PCR convencional (Cheng et al., 2018).

1.2.2.3.c. Reacción de amplificación isotérmica exponencial (*exponential isothermal amplification reaction*, EXPAR)

Se trata de una técnica muy sensible de amplificación isotérmica que combina la reacción de la mella de la endonucleasa con la extensión de la hebra por la polimerasa. Debido a su rendimiento isotérmico, tiene una elevada eficiencia y rápida cinética de amplificación, pudiendo ser aplicada esta técnica a microARNs (Van Ness, Van Ness and Galas, 2003)(Jia et al., 2010).

Chen y colaboradores desarrollaron el método SEXPAR (*isothermal symmetric exponential amplification reaction*) basado en la técnica EXPAR. Este nuevo método utiliza como *template* la estructura simétrica STD (*symmetric toehold dumbbell-template*) la cual permite que en el proceso de amplificación no haya pérdida en la eficiencia de la reacción. Se trata de un método ultrasensible que permite la discriminación de miARNs que difieren en una sola base. Método con una alta precisión, mayor a la de la RT-qPCR y otros métodos basados en EXPAR (J. Chen et al., 2018). También es importante destacar el papel de Zhang y colaboradores que desarrollaron un sistema integrado de detección digital en gotas (*Integrated Comprehensive Droplet Digital Detection*, IC 3D) para la cuantificación precisa de miARNs directamente en la muestra de plasma sanguíneo con un tiempo de ejecución de 3 horas. En este método las muestras de plasma contienen los miARNs encapsulados en microgotas lo cual permite la cuantificación digital,

utilizándose como método de detección la técnica EXPAR y realizándose el conteo a través del contador de partículas 3D que permite la cuantificación de las gotas de forma rápida y con alto rendimiento (Zhang *et al.*, 2015).

1.2.2.4. Métodos químicos de detección

1.2.2.4.a. SYBR Green

Esta química de detección utiliza el fluoróforo SYBR Green I, el cual se intercala en el ADN de doble cadena durante la formación del producto de PCR. Se une indistintamente al producto específico estudiado como a productos inespecíficos. El análisis de las curvas de disociación se utiliza para identificar el producto o productos amplificados. El valor de la temperatura de *melting* del producto depende de la longitud y de su composición de pares de bases (pb). Por tanto, la curva de disociación correspondiente al producto diana debe de tener un único pico bien definido, con temperatura de *melting* constante en todas las muestras, sin la presencia de otras curvas de disociación de distinta Tm (temperatura de fusión o temperatura de *melting*) que indicarían la presencia de productos inespecíficos en la reacción (Ye *et al.*, 2019).

1.2.2.4.b. Taqman

La técnica de PCR en tiempo real fue mejorada por la introducción de sondas marcadas con fluoróforo. La química de Taqman se caracteriza por el uso de una sonda fluorogénica que permite la detección de un producto específico en la PCR que se acumula a lo largo de los ciclos de amplificación. De modo general, estas sondas están formadas por un *reporter* fluorescente en el extremo 5' y un *quencher* en el extremo terminal 3'. Cuando la sonda está intacta, la proximidad del *quencher* reduce en gran parte la fluorescencia emitida por el *reporter* a través de la transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET, siglas en inglés). Cuando el ARN diana está presente, la sonda alinea *downtream* del cebador *Forward* y es escindida por la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa cuando este cebador se extiende. Por tanto, esta rotura de la sonda, por un lado, al separar al *reporter* del *quencher* permite el aumento de señal fluorescente emitida por el *reporter*, y por otro, al separar a la sonda del *target* permite la extensión de la copia del ARN. En cada ciclo de la PCR, el *reporter* se separa de su respectiva sonda, lo cual resulta en un aumento de la intensidad de fluorescencia proporcional a la cantidad de producto amplificado (Applied biosystem, 2005).

Existen dos tipos de sondas en base al *quencher* utilizado, las convencionales, descritas anteriormente y las sondas MGB (*minor groove binder*), que mejoran la especificidad. En el caso de las convencionales cuya longitud es aproximadamente de 30 hasta 40 pares de bases o superior pueden tener varias combinaciones de fluoróforos. Por ejemplo, las sondas Taqman TAMRA son sondas de doble marcaje que se caracterizan por tener el *reporter* fluorescente en 5' (FAM, VIC o TET) y en 3' un *quencher* fluorescente (TAMRA *dye*). En definitiva, las sondas Taqman TAMRA, fueron de las primeras sondas Taqman en utilizarse, por lo que actualmente tienen una gran variedad de aplicaciones. Las sondas convencionales también pueden tener

como *quencher* BHQ (*Black Hole Quencher*), Dabcyl, DDQ (*Deep Dark Quencher*) o BBQ (*BlackBerry Quencher*).

En el caso de las sondas MGB contienen un *reporter* en el extremo 5' e incorporan un ligando MGB (de unión al surco menor) conjugado en 3' que aumenta la T_m de la sonda y estabiliza los híbridos sonda-diana. Esto significa que las sondas TaqMan MGB pueden ser significativamente más cortas (de 15 a 20 pares de bases) que las sondas tradicionales, proporcionando una mejor discriminación de la secuencia y flexibilidad. Además, en el extremo 3' tienen un *quencher* no fluorescente (NFQ, *nonfluorescent quencher*). La ventaja que ofrece el *quencher* no fluorescente es que proporciona una menor señal de fondo lo que se traduce en una mayor precisión en la cuantificación (*TaqMan® Gene Expression Assays Protocol For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures, 2010*)(Applied biosystem, 2005). Son de gran aplicación para las pruebas de diagnóstico *in vitro* humano.

Entre las ventajas de utilizar una sonda Taqman cabe destacar que, para que se genere la señal de fluorescencia es necesaria la hibridación específica de la sonda con el *target*. Además, las sondas pueden marcarse con distintos *reporters*, lo cual permite la amplificación de dos secuencias distintas en un mismo tubo. No obstante, cabe tener en cuenta que se requiere la síntesis de distintas sondas, una por cada molécula a estudiar, suponiendo esto un elevado coste (Applied biosystem, no date).

La principal diferencia entre este sistema de detección y el SYBR Green, radica en que este último fluorocromo también se une a productos inespecíficos de doble cadena, ya comentado anteriormente, siendo menos específico y generándose, cuando la reacción no está optimizada falsos positivos. Sin embargo, al no utilizar sonda, se reduce el proceso de optimización además de una reducción del coste.

Tanto con el método de detección específico con sonda como con SYBR Green se pueden utilizar dos métodos de cuantificación, la RT-qPCR en un solo paso, lo que conocida como RT-qPCR *one step*, o en dos pasos, en los que la RT y qPCR se realizan en dos etapas, RT-qPCR *two steps*.

1.2.2.5. Métodos en base al diseño de cebadores para la RT

1.2.2.5.a. Métodos basados en *stem loop*

Chen y colaboradores describieron el método de RT en *stem loop* seguido de análisis con sonda Taqman. Se trata de un método revolucionario en dos pasos que proporciona una elevada sensibilidad, especificidad y precisión, y que, además, no se ve afectado por la contaminación de ADN genómico. El cebador *stem loop* de RT se une al extremo 3' del miARN, el cual es retrotranscrito por la enzima transcriptasa inversa. El producto de ADNc se amplifica con un cebador directo (cebador *forward*) específico y un cebador reverso (cebador *reverse*), detectándose la señal con una sonda Taqman. El concepto de diseño de cebador de RT en *stem loop* se puede utilizar para la cuantificación de otros pequeños ARNs como ARNs de interferencia (siARNs) y este autor ya indicó que se podría aplicar a la clonación de pequeños ARNs y a ensayos de multiplexado para mejorar la sensibilidad y especificidad (Chen *et al.*, 2005) (figura 3). De

hecho, aproximadamente un año después, Lao y colaboradores evaluaron los distintos pasos de la RT-qPCR multiplexada y propusieron varios diseños experimentales para maximizar la capacidad de detectar múltiples miARNs, entre ellos el paso previo de pre-amplificación (Lao *et al.*, 2006). Siguiendo esta misma línea y utilizando como cebador de RT el método de *stem loop*, se desarrolló una variante en la que se utilizaba una sonda Taqman universal (Jung *et al.*, 2013). Finalmente, Tong y colaboradores describieron un método que implica un cebador *stem loop* más largo que hibrida con el miARN en unos 11 pares de bases (en vez de 6), lo cual aumentaba la eficiencia de la RT-qPCR, utilizando como método de detección SYBR Green (Tong *et al.*, 2015).

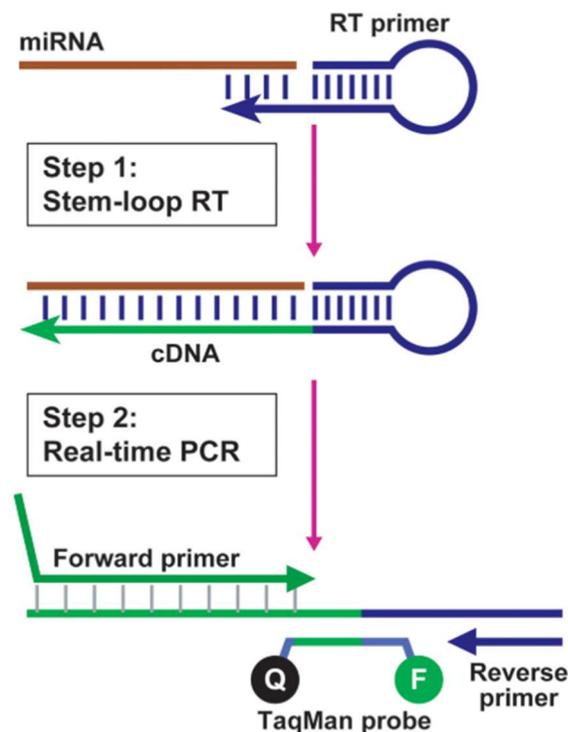


Figura 3. Descripción del procedimiento en dos pasos de RT-qPCR basado en *stem loop*. En el paso 1 se utiliza un cebador de RT específico basado en la tecnología *stem loop* para producir el ADNc. En el paso 2, el ADNc obtenido se amplifica en la qPCR con un cebador *Forward* específico y *Reverse* universal. La detección se realiza con una sonda Taqman específica. Fuente (Chen *et al.*, 2005).

1.2.2.5.b. Métodos basados en poliadenilación

Esta técnica descrita por Shi y Chiang y colaboradores se caracteriza por la poliadenilación del miARN maduro por la enzima poli (A) polimerasa añadiéndose en la reacción de RT un adaptador poli(T) para generar el ADNc. Este producto se amplifica con un cebador *Forward* específico y un cebador *Reverse* universal complementario al adaptador de la cola poli(T) detectándose el producto amplificado con SYBR Green (Shi and Chiang, 2005) (figura 4).

Utilizando como base esta tecnología de la poliadenilación del miARN, se desarrolló una variante en la que el producto de la RT se amplifica con un cebador de ADN *Forward* y *Reverse* específicos. La detección del producto también se realiza con el fluorocromo SYBR Green (Balcells, Cirera and Busk, 2011). Finalmente, Kang y colaboradores describieron una nueva variante en la que la

poliadenilación y unión del adaptador poli(T) del miARN servía, como se ha visto hasta ahora, para la RT, pero, además, a esta región se unirían en la PCR el cebador *Reverse* (universal) y una sonda Taqman (universal). En este caso, se utiliza un cebador *Forward* específico (Kang *et al.*, 2012).

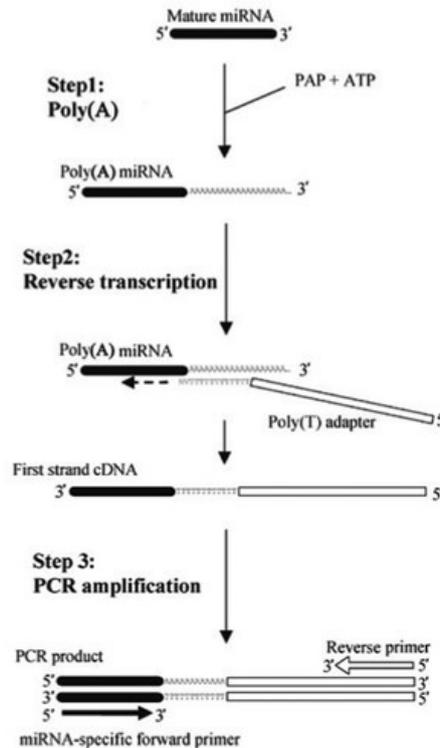


Figura 4. Método de RT-qPCR para miARNs basado en poliadenilación. Paso 1, se poliadenila todo el ARN, de manera que se obtiene miARNs poliadenilados. Paso 2, transcripción inversa de los miARNs poli(A) utilizando un adaptador poli(T). Paso 3, el ADNc se amplifica por PCR en tiempo real con un cebador *Forward* y un cebador *Reverse* complementario al adaptador poli(T). PAP, polimerasa poli(A). Fuente: (Shi and Chiang, 2005).

1.2.2.5.c. Métodos basados en ligamiento

El método descrito por Kumar y colaboradores implica la circularización del miARN por una ligasa. Esta estructura se retrotranscribe produciéndose repeticiones en tándem de la secuencia de ADNc que es complementaria al miARN. En la qPCR estas secuencias se amplifican al hibridar los cebadores y son detectadas con SYBR Green. Es importante destacar que esta estructura circular del miARN y las repeticiones en tándem del ADNc proporcionan flexibilidad para que los cebadores se unan en la posición adecuada (Kumar, Johnston and Kazakov, 2011).

Siguiendo la misma línea, se desarrolló una variante en la que se añade al miARN un adaptador universal de oligonucleótidos de ADN de manera que el cebador de RT universal se une a este adaptador. La etapa de qPCR se realiza con un *Forward* específico y un *Reverse* universal utilizando como método de detección el fluorocromo SYBR Green (Q. Ge *et al.*, 2014).

Finalmente cabe tener en cuenta el método Dumbbell, el cual utiliza la tecnología *stem loop*, desarrollada por Chen y colaboradores (Chen *et al.*, 2005), que reconoce específicamente al miARN. Esta variante se desarrolló con el objetivo de poder discriminar variantes de miARNs que difieren en 5' o 3'. La ligasa 2 de ARN T4 (Rnl2) une estos adaptadores *stem loop* al miARN, formando la estructura llamada 'dumbbell-like' que es amplificada con la sonda Taqman (Honda and Kirino, 2015).

1.2.2.6. Estrategias de cuantificación

1.2.2.6.a. Cuantificación absoluta

Este tipo de cuantificación permite determinar exactamente el número de copias por célula, por concentración de ADN/ARN o por muestra. Para ello, se construye una curva estándar y los valores de Ct obtenidos de la muestra estudio se interpolan en la curva de calibrado, obteniéndose el número exacto de copias. Normalmente se suele utilizar en áreas como la microbiología o virología, para correlacionar el número de copias víricas con el estado de la enfermedad. De esta forma, conocer el número exacto de copias de la molécula diana permite monitorizar el progreso de la enfermedad (Raymaekers *et al.*, 2009)(Applied biosystem, no date) (Roche, 2009).

1.2.2.6.b. Cuantificación relativa

Este tipo de cuantificación se utiliza para analizar los cambios en la expresión de los genes de una muestra en relación a otra muestra de referencia (por ejemplo, un control no tratado). Un ejemplo podría ser para medir la expresión de un gen en respuesta a un fármaco, de esta manera se compararía el nivel de expresión génica del gen de interés en una muestra tratada con el nivel de expresión génica de una muestra no tratada. Los métodos de cálculo utilizados para la cuantificación relativa son método de curva estándar y método comparativo Ct (Schwarzenbach *et al.*, 2015)(Roche, 2009)(Applied biosystem, no date). Este tipo de aproximación pretende eliminar las diferencias debidas al muestreo y a la calidad de las muestras (Schwarzenbach *et al.*, 2015).

En el método de cuantificación a través de una curva estándar la cantidad de la molécula diana se expresa en relación con alguna muestra base, como un calibrador (applied biosystem, 2008). Este método requiere que en la placa de reacción estén las curvas estándar por lo que se necesita mayor cantidad de reactivos y de espacio en la placa. Sin embargo, el proceso de validación es menor ya que no es necesario que la eficiencia de la reacción de la molécula diana y el control endógeno sean equivalentes. Esta aproximación proporciona resultados muy precisos ya que los valores cuantitativos obtenidos se interpolan en la curva estándar. Se aplica normalmente cuando se estudia un número bajo de moléculas diana y de muestras, y si se buscan cambios de expresión muy discretos (applied biosystem, 2008).

Si se utiliza el método comparativo de Ct, previamente se ha de validar que las eficiencias de amplificación del miARN diana y del control endógeno sean similares (Applied biosystem, no date)(Roche, 2009)(applied biosystem, 2008). El método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ es una forma adecuada y sencilla de analizar los cambios relativos en la expresión génica a partir de experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real, sin la necesidad de una curva estándar en la propia placa. En este cálculo se asume que la eficiencia de la RT-qPCR es de 2. El cálculo se realiza del siguiente modo:

$$\Delta Ct = Ct (\text{target}) - Ct (\text{referencia})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{muestra}) - \Delta Ct (\text{calibrador, control})$$

$$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

(Livak and Schmittgen, 2001)

Este método es útil cuando se estudia un número elevado de moléculas diana y/o muestras y en estudios de validación de estrategias de alto rendimiento (applied biosystem, 2008).

En el caso de los miARNs el método de cuantificación relativa es el más utilizado ya que tiene en cuenta los posibles errores debidos a la variación de ARN *input* y a la eficiencia de la RT. El método más preciso para corregir estos posibles errores es la normalización respecto a controles endógenos (Varkonyi-Gasic and Hellens, 2011)(Abdel Nour and Plaffl, 2020)(Bustin *et al.*, 2009). En estudios con pocos miARNs se suele utilizar uno o más controles endógenos. Normalmente la elección del miARNs endógeno control se basa en los resultados de un estudio de cribado en el que se muestra que la expresión es estable y que tiene el mismo comportamiento que la que la media global de todos los microARN expresados en la muestra (Mestdagh *et al.*, 2009)(Chang *et al.*, 2010). Si este estudio no se lleva a cabo la elección de los miARNs candidatos puede ser en base a la bibliografía publicada. Este miARN endógeno debe de cumplir una serie de características como tener unos niveles de expresión similares a los miARNs estudio, expresión constante en todas las muestras (no verse afectada por las condiciones experimentales) y tener un tamaño equivalente al de los miARNs (estabilidad similar, así como eficiencia de extracción y cuantificación similares)(Abdel Nour and Plaffl, 2020).

1.2.2.7. Consideraciones a tener en cuenta en el estudio de miARNs

En el estudio de miARNs a partir de muestras de biofluidos hay que considerar en primer lugar la selección del biomarcador/biomarcadores. En segundo lugar, hay que definir el tipo de muestra a utilizar (suero, plasma, saliva, orina o líquido cerebroespinal). En el caso de biofluidos derivados de la sangre, como suero y plasma, hay que tener en cuenta el efecto del anticoagulante en la muestra por lo que se seleccionará un tipo de tubo de recolección u otro (EXIQON, 2015)(Chorley *et al.*, 2021)(Moldovan *et al.*, 2014). Por ello, han de minimizarse las variables preanalíticas de recolección y procesamiento de la muestra, trabajando con unas condiciones estandarizadas y estableciéndose un control de calidad exhaustivo, ya que está bien definido que la cuantificación de los miARNs en suero y plasma se ve muy influenciada por estas variables (EXIQON, 2015)(McDonald *et al.*, 2011)(Pritchard *et al.*, 2012). Dentro de estas variables hay que considerar el efecto de la hemólisis: la liberación de los miARNs por la rotura de los eritrocitos puede enmascarar los resultados de la cuantificación de miARNs (Abdel Nour and Plaffl, 2020). Niveles bajos de hemólisis es un fenómeno bastante frecuente durante el

proceso de recolección del suero/plasma por lo que es importante su control y medición (Kirschner *et al.*, 2013). Esta variable puede ser medida por varios métodos, desde métodos basados en espectrofotometría hasta métodos de RT-qPCR (Blondal *et al.*, 2013)(Appierto *et al.*, 2014) (Pizzamiglio *et al.*, 2017). Finalmente, ya por lo que respecta a la muestra en sí cabe considerar la estabilidad de los miARNs, el tiempo y las condiciones de almacenamiento (Moldovan *et al.*, 2014)(EXIQON, 2015).

Por otro lado, en base al tipo de muestra se seleccionará la técnica de cuantificación de miARN y relacionado con esta, la estrategia de normalización. Sin embargo, en el caso de la técnica de RT-qPCR, ampliamente utilizada para el estudio de miARNs, no existe una forma estandarizada, por lo que esto supone uno de los principales retos en el estudio de miARNs de biofluidos (Chorley *et al.*, 2021). El paso siguiente es la selección del método de extracción del ARN, considerando que en las muestras de suero y plasma, la cantidad de miARNs, y en general de ARN, es baja, el procedimiento de extracción ha de ser robusto y reproducible lo cual se puede lograr utilizando protocolos estandarizados, minimizando la presencia de inhibidores y utilizando un *carrier* (Andreasen *et al.*, 2010), estableciéndose además, un control de calidad del ARN obtenido (Chorley *et al.*, 2021). La figura 5 muestra las principales consideraciones a tener en cuenta en el estudio de miARNs en biofluidos.

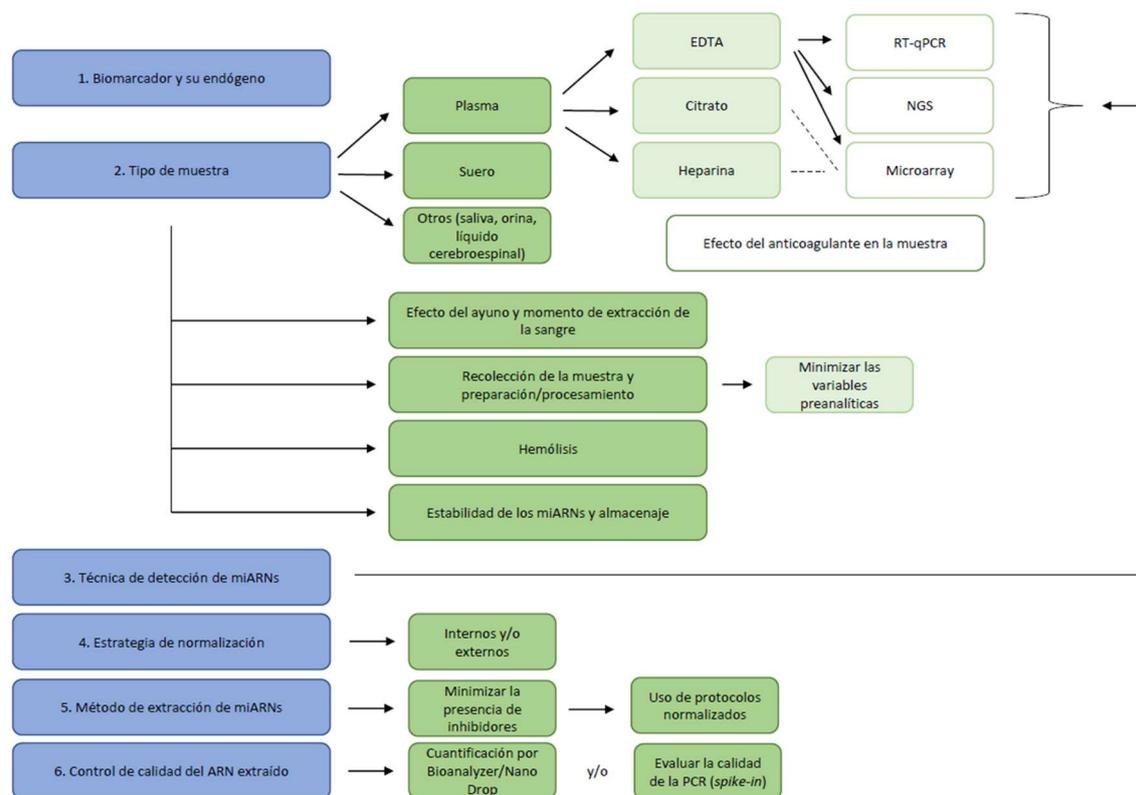


Figura 5. Resumen del flujo de trabajo en el estudio de miARN a partir de muestras de biofluidos.

No obstante, por lo que respecta a los miARNs en sí, la medición precisa y robusta se ve dificultada por la corta longitud en número de pares de bases y la gran divergencia de secuencias junto con una importante variación en el contenido de GC. Esto se traduce en que las propiedades de hibridación son distintas en cada uno de los miARNs, lo cual supone un desafío a la hora de detectar todos los miARNs diana simultáneamente, sobre todo por lo que respecta a aquellos miARNs de la misma familia que en ocasiones solo se diferencian en un único nucleótido (Blondal *et al.*, 2013).

La tabla 6 resume los principales problemas existentes en el estudio de miARNs en suero y plasma por PCR cuantitativa, así como posibles soluciones a considerar.

Tabla 6. Principales retos y soluciones propuestas para el estudio de miARNs en muestras de biofluidos qPCR. Adaptación de (EXIQON, 2015)

Desafío	Solución
Cantidad limitada de ARN	<ul style="list-style-type: none"> -Optimización del protocolo de extracción de ARN -Uso de un <i>carrier</i> en el proceso de extracción -Monitorizar la eficiencia del proceso de extracción (utilizando un <i>spike-in</i>) -Estandarizar la cantidad de ARN <i>input</i> por volumen
Componentes no deseados (por ejemplo, inhibidores de la PCR)	<ul style="list-style-type: none"> -No utilizar tubos de heparina -Utilizar métodos de aislamiento de ARN basados en columnas o en <i>beads</i> -Monitorizar la presencia de ARNasas o inhibidores (utilizando <i>spike-ins</i>)
Contaminantes celulares y hemólisis	<ul style="list-style-type: none"> -Garantizar que la recolección de la muestra sea consistente y óptima -Centrifugar las muestras de plasma/ suero para eliminar los restos celulares -Monitorizar el efecto de la hemólisis, utilizar algún indicador de hemólisis en la PCR o la absorbancia de la oxihemoglobina (414nm)
Variables preanalíticas	<ul style="list-style-type: none"> -Diseño experimental óptimo (replicados biológicos) -Controlar las fuentes de variación técnica (por ejemplo, los lugares de recogida)
Normalización	<ul style="list-style-type: none"> Utilizar normalizadores internos (miARNs endógenos estables) Utilizar normalizados externo Utilizar varios normalizadores

1.2.3. Otras técnicas

Existen otras técnicas de detección de miARNs que se utilizan en menor medida en investigación como son el *Northern blotting* y el ISH. En la tabla 7 se comparan estas dos técnicas con las técnicas de alto rendimiento descritas anteriormente, *arrays* y NGS, así como las técnicas clásicas de RT-qPCR.

Tabla 7. Características de las principales técnicas de detección de miARNs.

Técnica	Sensibilidad	Especificidad	Ventajas	Inconvenientes
<i>Microarray</i>	Media	Media	-Alto rendimiento -Rápido	- Semicuantitativo - No permite la identificación de nuevos miARNs
NGS	Alta	Muy alta	-Alto rendimiento -Estudio de genoma completo -Identificación de nuevos biomarcadores	- Elevado coste y tiempo - Infraestructura informática y complejidad en el análisis e interpretación de los datos
<i>Northern blotting</i>	Baja	Baja	-Procedimiento consolidado -No modificación en las secuencias de las bases	- Método semicuantitativo - Procedimiento largo y tedioso - Cantidad grande de muestra
ISH	Baja	Baja	-Colocalización -No es necesario la lisis celular	- Semicuantitativa - No apto para miARNs circulantes
RT-qPCR	Alta	Media	-Cuantificación automática -Amplio rango dinámico -Aplicable a la práctica clínica	- Rendimiento medio - No permite la identificación de nuevos miARNs - ARN con alto grado de pureza - Diseño de cebadores complejo

1.3. Desarrollo de producto sanitario de diagnóstico *in vitro* (*In vitro diagnostic, IVD*)

Como ya se ha comentado anteriormente en otros apartados, los biomarcadores epigenéticos pueden ser utilizados para el diagnóstico precoz, la predicción del curso de la enfermedad, la selección del tratamiento, y la monitorización del paciente o de su respuesta frente al tratamiento aplicado. La metilación del ADN y los microARNs son más estables que el ARN (ARN mensajero o los ARN largos no codificantes) y las proteínas lo que propicia que estos biomarcadores sean más prácticos y viables en entornos clínicos y cuando se trabaja con biopsia líquida (Faruq and Vecchione, 2015)(Hashimoto, Zumwalt and Goel, 2016)(García-Giménez *et al.*, 2017). Estas dos marcas epigenéticas junto con las modificaciones postraduccionales (en inglés, *post-translational modifications*, PTMs) de las histonas, a diferencia de las marcas genéticas o proteicas, tienen una naturaleza dinámica y proporcionan información sobre la

función de los genes a los que regulan. Además, informan sobre los mecanismos moleculares que se alteran durante el desarrollo de la enfermedad y más importante aún, su detección o cuantificación está optimizada en técnicas rutinarias de laboratorio clínico como puede ser la RT-qPCR. Todas estas características en conjunto hacen que los biomarcadores epigenéticos sean una fuente atractiva para ser utilizados en la medicina de precisión (Beltrán-García *et al.*, 2019). Sin embargo, en muchos casos, los resultados obtenidos de los estudios de investigación no aportan suficiente evidencia para ser extrapolados al ámbito clínico. Para que el biomarcador tenga utilidad clínica y cumpla con la normativa reglamentaria de un producto sanitario (PS) IVD, los estudios de investigación del biomarcador deben ir seguidos de investigaciones sistemáticas bien diseñadas de las cuales se puedan extraer datos de funcionamiento analítico, validez clínica, y estabilidad que permitan cumplir con la reglamentación. De hecho, solamente el 1% de los biomarcadores identificados en los estudios de investigación se implementa finalmente en un laboratorio clínico (Kern, 2012), siendo este porcentaje aún menor cuando se trata de biomarcadores epigenéticos.

Un PS IVD se define como cualquier producto sanitario que consista en un reactivo, producto reactivo, calibrador, material de control, estuche de instrumental y materiales, instrumento, aparato, equipo o programa informático o sistema, utilizado solo o en asociación con otros, destinado por el fabricante a ser utilizado *in vitro* para el estudio de muestras procedentes del cuerpo humano, incluidas las donaciones de sangre y tejidos, sólo o principalmente con el fin de proporcionar información sobre: (a) relativa a un proceso o estado fisiológico o patológico, (b) relativa a una deficiencia física o mental congénita, (c) relativa a la predisposición a una dolencia o enfermedad, (d) para determinar la seguridad y compatibilidad con receptores potenciales, para predecir la respuesta o reacción al tratamiento, y (e) para establecer o supervisar medidas terapéuticas. Los recipientes para la recolección de las muestras se consideran productos sanitarios para diagnóstico *in vitro*. Por "recipientes de muestras" se entiende los productos, tanto si en ellos se ha hecho el vacío como si no, destinados específicamente por el fabricante a la contención directa y a la conservación de muestras procedentes del cuerpo humano para un examen IVD (AEMPS, 2021).

Cabe tener en cuenta que el nuevo Reglamento de Productos Sanitarios para diagnóstico *In Vitro* que fue aprobado el 05 de abril de 2017 es el Reglamento (UE) IVDR 2017/746 y será aplicable a partir del 26 de mayo de 2022. Según el nuevo Reglamento, el kit Scolipro® se clasificaría como producto C por "estar destinado a ser utilizado como prueba diagnóstica para selección terapéutica". Aunque, según la Directiva anterior no conlleva evaluación por un Organismo Notificado, el nuevo reglamento sí requiere de un Organismo Notificado ya que solo se excluyen artículos de uso general en laboratorio o utilizados solo para fines de investigación, salvo que el fabricante los destine a su uso en un examen diagnóstico *In Vitro*. Sin embargo, es importante destacar que hasta 2022 se puede hacer uso de la legislación española y la directiva vigente por lo que no se requiere la participación de Organismo Notificado, sino que el marcado CE se obtiene por "Autodeclaración".

Por lo que respecta al proceso de desarrollo de un kit IVD para uso clínico hay que tener en cuenta varias etapas. En primer lugar, a través de estudios de investigación se identifica el biomarcador, o biomarcadores, candidato para el uso clínico final que se persigue, así como la

población o poblaciones en estudio (fase de descubrimiento) (figura 6a). En segundo lugar, una vez identificado el biomarcador, ha de definirse la tecnología que se va a utilizar, es decir, con qué técnica se va a detectar al biomarcador en la muestra del paciente (figura 6b). El rendimiento de la tecnología elegida se va a determinar en el proceso de validación analítica. Esta fase implica la definición y desarrollo del prototipo del kit (figura 6c). En esta etapa se estudian los parámetros analíticos de sensibilidad y especificidad. Es importante detenerse en este punto y describir de manera detallada estos parámetros analíticos, en concreto, aquellos derivados de la técnica de RT-qPCR utilizada como método para la cuantificación de miARNs en el kit ScoliPro®. En el rendimiento de un ensayo de RT-qPCR se consideran principalmente cuatro características: 1) eficiencia de la PCR, 2) rango dinámico lineal, 3) límite de detección (LOD) y 4) precisión.

Los ensayos robustos se correlacionan con eficiencias altas, las cuales se determinan a partir de curvas de calibrado. La pendiente de la curva obtenida de la parte lineal proporciona información sobre la eficiencia (Eficiencia $E = 10^{-1/\text{pendiente}}$), la sensibilidad y la robustez del ensayo (Abdel Nour and Plaffl, 2020). En una curva de calibrado preparada por diluciones 1:10 el valor de pendiente esperado es de -3.32 cuando la eficiencia es de 2, lo cual indica que la cantidad de *template* se dobla en cada ciclo (Roche, 2009).

El rango dinámico lineal se define como el número de copias más alto y bajo cuantificable incluido dentro del intervalo en el que el *target* es cuantificado. La curva de calibración debe cubrir el intervalo en el que el ácido nucleico diana se expresa (Abdel Nour and Plaffl, 2020).

La sensibilidad analítica se refiere al número mínimo de copias en una muestra que puede ser medida con precisión en un ensayo, mientras que la sensibilidad clínica es el porcentaje de individuos con una alteración/enfermedad dado/a que el ensayo identifica como positivos para esa condición (Bustin *et al.*, 2009). Normalmente la sensibilidad se expresa como el límite de detección (LOD, siglas en inglés). El LOD, es la concentración o cantidad más baja de analito que puede ser detectada en un 95% de las veces en una muestra pero no necesariamente cuantificada (Abdel Nour and Plaffl, 2020)(ISO, 2019). El límite de cuantificación (LOC, siglas en inglés) es la concentración o cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser determinada con una certeza estadística bajo condiciones experimentales establecidas (ISO, 2019).

En un procedimiento analítico, la precisión expresa la proximidad, concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas a partir de muestreos múltiples de la misma muestra en unas condiciones prescritas. La precisión debe de ser estudiada utilizando muestras reales homogéneas. Sin embargo, si no es posible obtenerlas se pueden utilizar muestras preparadas artificialmente o soluciones de muestras. La precisión puede ser considerada en tres niveles: repetitividad, precisión intermedia y reproducibilidad. En un procedimiento analítico la precisión se expresa normalmente como una variación, desviación estándar (SD) o coeficiente de variación (CV) de una serie de mediciones (ICH, 1995). A nivel práctico han de considerarse dos condiciones: repetitividad y reproducibilidad. Estas son las dos medidas de precisión que se pueden obtener (Kralik and Ricchi, 2017a)(*Guía Eurachem. La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos. Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados*, 2016).

La repetitividad (*short-term precision* o variación intraensayo) se refiere a la precisión y robustez del ensayo con las mismas muestras analizadas repetidamente en el mismo ensayo. Se puede expresar como la desviación estándar de la variación de los valores de Ct. Alternativamente, se puede expresar como la SD o CV del número de copias o de la concentración (Bustin *et al.*, 2009). La reproducibilidad (*long-term precision* o variación interensayo) se refiere a la variación de los resultados entre ensayos repetitivos en un mismo laboratorio o entre distintos laboratorios y se expresa normalmente como la SD o el CV (Bustin *et al.*, 2009). Es importante tener en consideración que, en la qPCR, la precisión puede verse afectada por las diferencias de temperatura que afectan al alineamiento o la desnaturalización, las diferencias en la concentración del analito introducidas por el error de pipeteo, y la variación estocástica. La precisión normalmente varía con la concentración y con la disminución del número de copias (Bustin *et al.*, 2009).

Finalmente, el último parámetro para tener en cuenta es la especificidad analítica. En un ensayo de qPCR se refiere a la capacidad de detectar la secuencia diana en lugar de otras no específicas que también están presentes en la muestra (Bustin *et al.*, 2009). La especificidad de la PCR depende principalmente de lo preciso que sea el diseño de los cebadores (Roche, 2009).

Una vez determinados todos estos parámetros analíticos y continuando con los pasos para el desarrollo de un kit IVD, la etapa siguiente es la búsqueda de evidencia clínica a través de un estudio de funcionamiento. Es en este punto donde se ve la importancia de definir bien desde el principio del proceso de desarrollo del kit cuál va a ser su uso y cuál va a ser la población a la que va a ir dirigido. De esta manera esta fase de validación se va a realizar de forma bien controlada y sistemática con la cohorte definida. El estudio clínico puede ser retrospectivo, prospectivo o ambispectivo y tiene como objetivo demostrar el beneficio y la seguridad del uso del biomarcador en la práctica clínica (figura 6d). De este estudio han de generarse datos de suficiente calidad para que el biomarcador cumpla con todos los requisitos del Reglamento IVDR, EU 2017/746 en la Unión Europea y poder obtener el mercado CE (Conformidad Europea) y con aquellos procedimientos establecidos por la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA, *Food and Drug Administration*) en Estados Unidos.

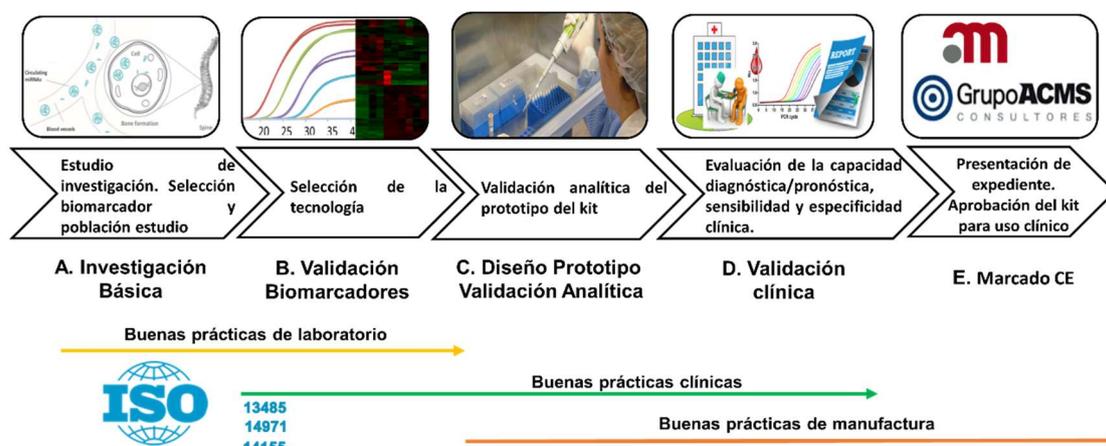


Figura 6. Descripción de los pasos para el desarrollo de un kit IVD desde el estudio de investigación (a) hasta su uso en la práctica clínica (e), pasando por la selección de la tecnología (b), la validación analítica (c) y la validación clínica (d).

En el caso de la normativa española para poder comercializar este tipo de productos se ha de obtener por parte de la AEMPs la licencia previa de fabricante, importador o de agrupador de producto sanitario IVD. Una vez concedida esta condición, se prepara un expediente técnico que ha de ir acompañado de la implementación de la ISO 13485, y la gestión de riesgos según ISO17971 para que un cuerpo notificado determine si se cumplen los requisitos y se concede el marcado CE (figura 6e). En concreto el expediente técnico debe incluir:

- Descripción y especificaciones del producto (incluidas las variantes y accesorios)
- Documentación relativa al sistema de calidad (documentación sistemática y ordenada en forma de planes y procedimientos escritos, programas de calidad, planes de calidad, manuales de calidad y registros de calidad) que incluye descripción detallada de:
 - Los objetivos de calidad del fabricante
 - La organización de la empresa y, en particular:
 - Las estructuras de organización, las responsabilidades de los directivos y su autoridad organizativa en materia de la calidad del diseño y de la fabricación de los productos.
 - Los métodos para controlar el funcionamiento eficaz del sistema de calidad y, en particular, su aptitud para conseguir la calidad deseada en el diseño y en el producto, incluido el control de los productos no conformes.
- Información sobre el diseño y fabricación (subcontratistas en el caso de haberlos, con inclusión de las características de los materiales de base, de las características y limitaciones del funcionamiento del producto)
- Requisitos generales de seguridad y funcionamiento
- Descripción para la comprensión del funcionamiento del producto
- Análisis de beneficios y riesgos y gestión de riesgos
- Resultados de los cálculos de diseño y de las inspecciones efectuadas, etc.
- Verificación y validación del producto (informe con los datos preclínicos y clínicos e información adicional requerida en casos específicos)
- Etiquetas e instrucciones de utilización
- Resultados de los estudios de estabilidad
- Si para que el producto funcione se ha de combinar con otro producto o productos, se deben de aportar pruebas de que al estar combinado con cualquier producto de ese tipo que tenga las características especificadas por el fabricante, cumple con los requisitos esenciales.
- Datos adecuados de evaluación del funcionamiento, que demuestren el funcionamiento indicado por el fabricante y avalados por un sistema de medidas de referencia (en el caso de que haya) además de la información sobre los métodos y

materiales de referencia, así como las unidades de medida, los valores conocidos de referencia y la exactitud. Todo ello debe de haberse recopilado de estudios en un entorno clínico o el adecuado o a partir de información bibliográfica apropiada.

Los productos deberán cumplir los requisitos generales de seguridad y funcionamiento que les sean aplicables teniendo en cuenta su finalidad prevista. El fabricante del PS demuestra la conformidad acorde a la clasificación del producto en función del riesgo (AEMPS, 2021).

Por otro lado, por lo que respecta al mercado de los kits IVD, actualmente, la gran mayoría de estos kits epigenéticos están basados en la metilación del ADN como biomarcador. Esto se debe a que esta modificación epigenética es de las más estudiadas y lo suficientemente estable durante el procesamiento de la muestra y las condiciones de almacenaje de la misma (Kristensen *et al.*, 2009). Los biomarcadores epigenéticos, así como algunos kits de diagnóstico IVD basados en ellos se encuentran más ampliamente en oncología (segunda causa de muerte en el mundo) ya sea como medio diagnóstico/pronóstico, de selección terapéutica o de monitorización/vigilancia de la respuesta al tratamiento (García-Giménez *et al.*, 2017).

Se han desarrollado kits de diagnóstico basados en marcadores epigenéticos para cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, vejiga, próstata, cérvix uterino y cánceres en los que no se conoce cuál su origen (Beltrán-García *et al.*, 2019). Además de kits para el manejo de cánceres como glioblastoma, cáncer de mama y cánceres de los que se desconoce el origen. Finalmente, en este campo se han desarrollado dos kits IVD para evaluar el efecto del tratamiento en pacientes con cáncer de colon y de vejiga (Taryma-Leśniak, Sokolowska and Wojdacz, 2020).

Sin embargo, el número de kits IVD basados en miARNs es mucho menor. El interés de estas biomoléculas como biomarcadores se debe a su implicación en la regulación de la expresión génica, así como en la homeostasis celular y la señalización de los tejidos. Pero lo más importante es su estabilidad en las muestras biológicas y su accesible cuantificación en un gran abanico de bioespecímenes distintos (Beltrán-García *et al.*, 2019). Por un lado, el kit miRpredX 31-3p CE-IVD (IntegraGen S.A., France) para pacientes con cáncer colorrectal metastásico (mCRC) cuya muestra de partida es miARNs de tejidos. En concreto, se utiliza el ARN obtenido de muestras FFPE (*Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*) de tumores primarios. La técnica sobre la que se basa este kit es la técnica de RT-qPCR, estableciéndose como *cut off* un nivel de expresión del miR-31-3p (Ramon *et al.*, 2018)(Coulter, 2012). Este valor permite diferenciar aquellos pacientes que tienen una alta o baja expresión del miARN. La expresión de este miARN en los tumores primarios de pacientes *wild type* (WT) para RAS permite predecir la respuesta al tratamiento con anti-EGFR (Manceau *et al.*, 2014)(Laurent-Puig *et al.*, 2016)(Laurent-Puig *et al.*, 2015). Los pacientes con bajos niveles del miR-31-3p tienen una mejor respuesta al tratamiento con anti-EGFR comparado con el tratamiento anti- VEGF (*Vascular endothelial growth factor*). También tienen una mejor respuesta con anti-EGFR respecto a cuando se les subministra solamente quimioterapia o se utiliza como segunda u otra línea de tratamiento. Por el contrario, cuando estos pacientes tienen niveles altos de expresión del miARN tienen una respuesta similar tanto si se les somete a tratamiento anti-EGFR como anti-VEGF. Estos pacientes también tienen mayor respuesta cuando solamente se les administra quimioterapia respecto a cuando se les

trata con anti-EGFR (cuando se utiliza para segundas o posterior línea de tratamiento). Por otro lado, el kit ColoFast también para el diagnóstico precoz del cáncer colorrectal (CCR). En este caso la muestra de partida es plasma. El desarrollo de kits para el estudio de cáncer colorrectal es debido a que esta es una de las principales causas de muerte y enfermedad en hombres y mujeres en Estados Unidos (Siegel, Naishadham and Jemal, 2013). Es importante considerar que el proyecto/ensayo europeo para la validación y comercialización de esta prueba finalizó el pasado 30 de junio de 2021. Por ello, ColoFast todavía no está disponible en la página web de la compañía Amadix. Esta enfermedad representa actualmente uno de los principales problemas de salud en todo el mundo. La comunidad de médicos está de acuerdo en que este número de muertes relacionadas con el CCR podría evitarse con programas de cribado adecuados para la detección precoz, ya que cuando el cáncer de colon se detecta en los estadios localizados tempranos (I-II) la tasa de supervivencia a los 5 años es del 90%. Sin embargo, esta tasa desciende al 12% cuando los pacientes son diagnosticados en estadio IV y con metástasis. Por ello, es necesaria una herramienta de cribado que tenga mayor sensibilidad, especificidad y mejor cumplimiento que las pruebas fecales que se utilizan en la actualidad y que, al mismo tiempo, sea rentable para el sistema sanitario. Con el objetivo de resolver este escenario, la empresa española Amadix ha desarrollado esta prueba de detección no invasiva de adenomas avanzados y cáncer colorrectal basada en la determinación de un perfil de 6 miARNs mediante RT-qPCR en muestras de plasma. Esta firma de biomarcadores de cribado ofrece un rendimiento superior en términos de sensibilidad, especificidad, cumplimiento y rentabilidad que cualquiera de las pruebas ya existentes en el mercado o que se encuentran actualmente en desarrollo. En general, la comercialización de ColoFast tendrá un gran impacto ya que reducirá la tasa de mortalidad y el coste del tratamiento (ahorro de costes para los Servicios Nacionales de Salud) y mejorará la calidad de vida de los pacientes ahorrando en el costo asociado al CCR, contribuyendo también a cumplir las prioridades europeas de mejora de la asistencia sanitaria (Amadix, 2020).

Otro kit, aunque solo está indicado para investigación, es el kit OsteomiR™, desarrollado por TamiRNA, también basado en una firma de miARNs. En este caso también se utiliza la técnica de RT-qPCR partiéndose de muestras de suero. La firma de 19 microARNs sobre la que se desarrolla el kit están relacionados con el riesgo de fractura en mujeres postmenopáusicas y personas diabéticas con osteoporosis (Weilner *et al.*, 2015)(Weilner *et al.*, 2016)(Hackl *et al.*, 2016)(Heilmeier *et al.*, 2016)(Kocijan *et al.*, 2016). Esta misma compañía también ha desarrollado otro kit basado en 11 miARNs de plaquetas, pero solo para fines de investigación, thrombomiR™. Este kit está diseñado para el seguimiento de la terapia antiplaquetaria, la evaluación del riesgo de eventos cardiovasculares o el diagnóstico temprano de la diabetes tipo 2 (Bye *et al.*, 2016)(Kaudewitz *et al.*, 2016)(Mayr *et al.*, 2013)(Willeit *et al.*, 2013)(Willeit *et al.*, 2017)(Zampetaki *et al.*, 2012)(Zampetaki *et al.*, 2010)(Sunderland *et al.*, 2017). En ambos kits, se están llevando a cabo actualmente los ensayos clínicos para probar su validez clínica.

Para finalizar, es importante tener en cuenta que, en definitiva, el salto desde la identificación del biomarcador hasta el desarrollo de un producto IVD va a depender en gran medida del interés empresarial. Además, se trata, como se ha descrito anteriormente, de un proceso largo y costoso desde el punto de vista normativo. Un ejemplo de ello es el estudio llevado a cabo recientemente por Jung y colaboradores en el que se compara el coste/beneficio, desde el punto

de vista económico y de salud, de un test genético/epigenético desarrollado para evaluar el riesgo de enfermedad coronaria respecto a los métodos actuales. Los resultados muestran que el uso del test Epi + Gen CHD™ se asocia tanto a una mejor supervivencia de los pacientes como a un aumento del ratio de coste-efectividad/rendimiento (Jung *et al.*, 2021). Otro ejemplo podría ser el miR-122-5p, un miARN bien caracterizado como biomarcador en sangre de daño hepático y homeostasis del hígado y que cumple los requisitos para ser utilizado como un biomarcador no invasivo (niveles altos de expresión, específico de tejido, conserva homología entre especies y se libera en los biofluidos) (Trebicka *et al.*, 2013)(LS *et al.*, 2018). Sin embargo, aunque incorporar este miR-122 al panel de biomarcadores que se utiliza en la rutina clínica ha demostrado ser beneficioso tanto en el ámbito clínico como en el no clínico, el coste añadido de la monitorización/vigilancia de este miARN no proporciona un beneficio general, a pesar de mejorar la predicción y la evaluación en las enfermedades hepáticas inducidas por fármacos (Chorley *et al.*, 2021). Esto refleja de nuevo que el tema económico es un factor importante en el desarrollo de un miARN como biomarcador, pudiéndose extrapolar estos resultados a otras pruebas epigenéticas. Sin embargo, empresas como *EXACT Sciences Corporation* están revolucionando el cribado del cáncer colorrectal. De hecho, han desarrollado el test Cologuard®, una prueba de ADN en heces no invasiva, aprobada por la FDA, para el cribado del cáncer colorrectal. La prueba de ADN incluye el estudio de metilación de *NDRG4* y *BMP3*, y la *β -actina*, además de ensayos moleculares cuantitativos para las mutaciones de *KRAS* y un inmunoensayo de hemoglobina (Imperiale *et al.*, 2014). Además, esta compañía lidera estudios de metilación del ADN en cáncer de esófago, carcinomas hepatocelulares y cáncer de páncreas. Todo ello muestra la importancia y el impacto que están teniendo los biomarcadores epigenéticos en la medicina de precisión.

2. ANTECEDENTES E HIPÓTESIS, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. Antecedentes e Hipótesis

Cada vez existe una mayor necesidad de disponer de mejores marcadores biológicos que permitan detectar de forma precoz las enfermedades humanas. Los marcadores permiten mejorar la prevención primaria, el diagnóstico y el pronóstico de las enfermedades humanas. Además, permiten adecuar tratamientos según las características del paciente, dando pasos a la medicina personalizada. Las pruebas genéticas complementarias a los métodos tradicionales han sido útiles para mejorar el abordaje de diversas enfermedades, pero con frecuencia estos métodos se muestran incapaces de identificar las causas de enfermedades de fisiopatología compleja como son las enfermedades metabólicas, neurológicas, cancerosas, sépticas y las enfermedades raras (García-Gimenez, 2015). En los últimos años la epigenética ha emergido con fuerza para ayudar a solucionar estas situaciones clínicas.

La EIA es una enfermedad con elevada prevalencia en la población y un patrón de herencia complejo (M. Konieczny, Senyurt and Krauspe, 2013)(Fadzan and Bettany-Saltikov, 2017), que llega a provocar grandes incapacidades en algunos de los pacientes suponiendo un alto coste sanitario.

El grupo de investigación CIBERER U733 en colaboración con la empresa EpiDisease S.L. desarrolló una investigación en el ámbito de los miARNs en la EIA como marcadores epigenéticos. Como resultado se identificó y patentó una firma de miARNs que permitió identificar los pacientes con EIA con respecto una cohorte de individuos sanos y además determinar el grado de gravedad de la enfermedad. Este método diagnóstico fue protegido mediante patente europea “Kit and method for the diagnosis/prognosis of Idiopathic Scoliosis (EP15382319.0)”. En 2015 fue licenciada a la empresa EpiDisease SL y se ha obtenido la concesión en Europa y Estados Unidos, mientras que sigue en fase de evaluación en Canadá y China.

En un ensayo de validación de la tecnología por medio de un ensayo clínico a pequeña escala, se obtuvo una sensibilidad del 93%, especificidad del 73% y el AUC de 0.95 para diagnóstico y de 0.90 para la subclasificación de la gravedad de la enfermedad, datos que superaron ampliamente a los de la técnica “gold standard” actual, basada en rayos X. Esta firma está formada por miR-122-5p, miR-27a-5p, miR-223-5p y miR-1306-3p (J. García-Giménez *et al.*, 2018).

La búsqueda de los miARNs que conforman la firma en las bases de datos permitió identificar las rutas moleculares en las que participan. Los resultados mostraron que estos pequeños ARNs regulan genes que participan en las rutas Wnt (hsa04310) y BMP (*bone morphogenic protein*), principalmente, las cuales son muy importantes en la diferenciación de los osteoblastos/osteoclastos y el metabolismo óseo (J. L. García-Giménez *et al.*, 2018). El carácter dinámico de los miARNs, cuyas modificaciones temporales se asocian con la evolución de la enfermedad, sustentan su poder como biomarcador de progresión o pronóstico. En base a ello se plantea la hipótesis principal:

La expresión de estos biomarcadores podría informar sobre la aparición de la enfermedad

Antecedentes e hipótesis, justificación y objetivos

(diagnóstico) así como la variación en la expresión podría variar en correspondencia con la evolución clínica por lo que podría servir como herramienta para evaluar la progresión de la escoliosis. Por tanto, el desarrollo de un kit de diagnóstico molecular (denominado Scolipro®) para evaluar los niveles de estos biomarcadores serviría para optimizar el manejo clínico de la enfermedad, permitiendo identificar precozmente qué adolescentes tienen la enfermedad y qué riesgo tienen de que la enfermedad progrese a curvaturas más severas.

2.2. Justificación del proyecto

Actualmente, el diagnóstico de la EIA se basa en radiografías las cuales no permiten un diagnóstico temprano y tampoco predecir el riesgo de agregación familiar de la enfermedad. Además, el uso de rayos X no tiene capacidad de pronóstico. La única prueba molecular desarrollada hasta el momento ha sido el test Scoliscore™, una prueba basada en SNPs (causas genéticas), pero que no ha sido aceptada por las autoridades sanitarias al no conseguir reproducir los resultados en otras poblaciones distintas a la de caucásicos estadounidenses (estudio inicial). En este contexto, el desarrollo del kit Scolipro® basado en biomarcadores epigenéticos, considera, por tanto, el efecto ambiental, y permitirá la detección temprana, el pronóstico y la monitorización de la EIA.

Scolipro® es un test PCR que se podrá realizar en cualquier laboratorio de diagnóstico genético. En este sentido, el equipo de PCR más extendido en estos laboratorios (al menos, antes de la pandemia por COVID-19) es el LightCycler 480II, líder en el diagnóstico *in vitro* (Roche Life Science), por lo que el desarrollo del kit Scolipro® se ha realizado sobre esta plataforma.

Sus principales ventajas son de naturaleza clínica y económica. Entre ellas se encuentran: 1) Aportar biomarcadores que complementen el criterio diagnóstico-pronóstico y racionalizar la terapéutica de la EIA; 2) Contribuir a la dilucidación de la etiología de la enfermedad; 3) Mejorar el manejo de la enfermedad en cuanto a eficacia y seguridad al disminuir el riesgo de carcinogénesis en los pacientes en la edad adulta al reducir la exposición a rayos-X durante el seguimiento de la enfermedad. La ventaja económica estriba en el ahorro para el sistema de salud que supondría la implementación de un programa de diagnóstico molecular que permita identificar tempranamente una persona que vaya a desarrollar la EIA, así como identificar qué pacientes van a progresar y cuáles no para programar de forma óptima las visitas de seguimiento y poder adelantar las cirugías de columna antes de que el paciente desarrolle curvaturas más severas que requieran de cirugías más complejas y costosas.

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo principal

Desarrollar el kit ScoliPro® y validar su uso clínico para el diagnóstico, el pronóstico y el seguimiento clínico de la EIA.

2.3.2. Objetivos secundarios

2.3.2.1. Científicos y de investigación

- Optimizar la RT-qPCR en la plataforma LightCycler480II (Roche Life Science) como metodología para la cuantificación de la firma de miARNs como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de la EIA.

- Evaluación de los parámetros analíticos con oligos mímicos y controles de referencia.

- Comparar los parámetros analíticos con la plataforma de referencia de QS5 (Thermo Fisher Scientific)

- Establecer una sistemática para la optimización de la RT-qPCR aplicable al estudio de miARNs. Elaboración de un flujograma.

- Evaluar la sensibilidad y la especificidad del método de RT-qPCR optimizado en muestras reales de plasma.

2.3.2.2. Objetivos industriales

- Diseñar el kit ScoliPro® para el diagnóstico y el pronóstico de la EIA basado en la detección en sangre periférica de la firma de miARNs patentada.

- Establecer el protocolo del ensayo de funcionamiento clínico del kit ScoliPro®.

- Validar el funcionamiento clínico del kit ScoliPro® con las muestras de pacientes participantes en el estudio.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. miARNs sintéticos

Para la optimización de la RT-qPCR se utilizaron oligonucleótidos de ARN monocatenario correspondientes a los miARNs estudiados (oligos mímicos). La secuencia de estos oligonucleótidos fue la siguiente:

miARN	Secuencia	Función
hsa-miR-27a-5p (EUROFINS)	AgggCTTAGCTgCTTgTgAgCA	Biomarcador EIA
hsa-miR-122-5p (EUROFINS)	TggAgTgTgACAATggTgTTTg	Biomarcador EIA
hsa-miR-223-5p (EUROFINS)	CgTgTATTTgACAAgCTgAgTT	Biomarcador EIA
hsa-miR-1306-3p (EUROFINS)	ACgTTggCTCTggTggTg	Biomarcador EIA
hsa-miR-191-5p (EUROFINS)	CAACggAATCCCAAAAAGCAGCTg	miARN endógeno, normalizador
Cel-miR-39 (miARN de <i>Caenorhabditis elegans</i>) (QIAGEN, ID 339390)	TCACCGGGTGTAATCAGCTTG	miARN exógeno, monitorización purificación miARNs/normalizador

3.1.2. Cebadores y sondas

Para la RT se eligió la tecnología basada en *stem-loop*. En la qPCR se trabajó con sondas FAM-BBQ. Se trata de un *quencher* no fluorescente o negro que es utilizado por la tecnología TaqMan® y combinado en este caso con el *fluorescent dye* FAM.

Los cebadores y sondas fueron diseñados por la compañía TIB MOLBIOL (Berlín, Alemania). De esta manera, se diseñó para cada miARN un cebador de RT específico, un cebador *Forward* (F) y *Reverse* (R) y una sonda (Chen *et al.*, 2005). Aquellos diseños que no superaron las pruebas de calidad fueron descartados y se solicitó un nuevo diseño. A continuación, se muestran los diseños de cada uno de los miARNs estudio:

hsa-miR-27a-5p diseño 1:

Tipo	Secuencia 5'-3'	Tm
miARN maduro	AgggCTTAGCTgCTTgTgAgCA	62,7°C
F	gAAACgAACAgggCTTAGC	54,5°C
R	gCCTCTCATgCTgACgAAT	54,6°C
Cebador RT	gCCTCTCAgCTgACgAATTCTgAgAggCTTTgCTCACAAGC	L:84°C
Sonda	FAM-CTgAgAggCTTTgCTCACAAGC-BBQ	60,7°C

hsa-miR-122-5p diseño 1:

Tipo	Secuencia 5'-3'	Tm
miARN maduro	TggAgTgTgACAATggTgTTTg	57,6°C
F	AATCgCTAACCCCTggAgTg	54,5°C
R	gCCTCTCAAAGCTgACgAAT	54,4°C
Cebador RT	gCCTCTCAgCTgACgAATTAATgAgAggCCAAACACC	L:84°C
Sonda	FAM -ATgAgAggCCAAACACCATTgTCA-BBQ	61,1°C

hsa-miR-122-5p diseño 2:

Tipo	Secuencia 5'-3'	Tm
miARN maduro	TggAgTgTgACAATggTgTTTg	57,6°C
F	gCAAgCgATT ggAgTgTgA	56,6°C
R	AggATgCCTgTACTTCggA	55,9°C
Cebador RT	CgACTCaggATg CCTgTACTTCggAACCT TCCTgAgTCg CAAACA CCATTgTC	L:84°C
Sonda	FAM - CCTTCCTgAgTCgCAAACACCATTg-BBQ	65,8°C

hsa-miR-223-5p diseño 1:

Tipo	Secuencia 5'-3'	Tm
miARN maduro	CgTgTATTTgACAAGCTgAgTT	53,9°C
F	AATCgCTAACCCCGTgTATTT	56,7°C
R	CCCTCTCACAgCgTTgACT	56,1°C
Cebador RT	CCCTCTCAC AgCgTTgACTACgATAg TgAgAggg AACTCagCTTgT C	L:78°C
Sonda	FAM -CgATAgTgAgAgggAACTCagCTTgTC-BBQ	62,4°C

hsa-miR-223-5p diseño 2:

Tipo	Secuencia 5'-3'	Tm
miARN maduro	CgTgTATTTgACAAGCTgAgTT	53,9°C
F	AATCgCTAACCCCGTgTATTT	56,7°C
R	CTCACTgCCTgTACTTCgg	55,5°C
Cebador RT	CCCTCTCACTg CCTgTACTTCggAACCT gTgAgAggg AACTCagCTTgTCA	L:72°C
Sonda	FAM -ACCTgTgAgAgggAACTCagCTTgT-BBQ	62,7°C

hsa-miR-223-5p diseño 3:

Tipo	Secuencia 5'-3'	Tm
miARN maduro	CgTgTATTTgACAAGCTgAgTT	53,9°C
F	TCgCTAACCCCG TgTATTTgA	58,5°C
R	CTCACTgCCTgTACTTCgg	55,5°C
Cebador RT	CCCTCTCACTg CCTgTACTTCggAACCT gTgAgAggg AACTCagCTTgTCA	L:72°C
Sonda	FAM -ACCTgTgAgAgggAACTCagCTTgT-BBQ	62,7°C

hsa-miR-1306-3p diseño 1:

Tipo	Secuencia 5'-3'	Tm
miARN maduro	ACgTTggCTCTggTggTg	58,3°C
F	AATCTCTAATgCACgTTggCT	55,5°C
R	CCCTCTCACAgCgTTgACT	56,1°C
Cebador RT	CCCTCTCAC AgCgTTgACTACgATAg TgAgAggg CACCACCag	L:78°C
Sonda	FAM -CgATAgTgAgAgggCACCACCag-BBQ	63,4°C

hsa-miR-1306-3p diseño 2:

Tipo	Secuencia 5'-3'	Tm
miARN maduro	ACgTTggCTCTggTggTg	58,3°C
F	AATCTCTAATgCACgTTggCTC	56,7°C
R	CTCACTgCCTgTACTTCgg	55,5°C
Cebador RT	gCCTCTCACgCCTgTACTTCggAACCTgTgAgAggCCACCACCAgAg	L:72°C
Sonda	FAM -ACCTgTgAgAgggCACCACCA-BBQ	64,2°C

hsa-miR-191-5p diseño 1:

Tipo	Secuencia 5'-3'	Tm
miARN maduro	CAACggAATCCCAAAAgCAGCTg	65,1°C
F	CCAAgCgATCAACggAATC	56,7°C
R	ATgCCTgTACTTCggAACC	55,8°C
Cebador RT	CgACTCAGgATgCCTgTACTTCggAACCTTCCTgAgTCgCAGCTgCTTTTgg	L: 80°C
Sonda	FAM -TCCTgAgTCgCAGCTgCTTTTgg-BBQ	64,7°C

Cel-miR-39 diseño 1:

Tipo	Secuencia 5'-3'	Tm
miARN maduro	TCACCGGGTGTAATCAGCTTG	60,4°C
F	AAgCgATTCACCgggTg	57,1°C
R	ATgCCTgTACTTCggAACC	55,8°C
Cebador RT	CgACTCAGgATgCCTgTACTTCggAACCTTCCTgAgTCg CAAGCTgATTACA	L:80°C
Sonda	FAM -TTCCTgAgTCgCAAGCTgATTACA-BBQ	61,8°C

3.1.3. Reactivos comerciales

- miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen) (217184)
- TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific) (4366597)
- TaqMan Universal Master Mix II kit, no UNG (Thermo Fisher Scientific) (4440047)
- TaqMan smallRNA assays (Thermo Fisher Scientific)
 - Assay hsa-miR-27a* (002445)
 - Assay hsa-miR-122 (002245)
 - Assay hsa-miR-223* (002098)
 - Assay hsa-miR-1306 (241056)
 - Assay hsa-miR-191 (002299)
 - Assay hsa-miR-23a-3p (000399)

- Assay hsa-miR-451a (001141)
- Cel-miR-39* (00200)
- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche) (04897030001)
- LightCycler 480 SYBR Green I Master (04 707 516 001)
- LightCycler 480 Probes Master Mix kit (Roche) (04887301001)
- Master mix FIREPol (Solis BioDyne, 7.5mM MgCl₂) (04-12-00115)
- QX Alignment Marker 15pb/600pb (ref: 509929520) (QIAGEN)
- FirstChoice® Human Brain Total RNA (Thermo Fisher Scientific) (Product nº AM7962)
- Pool de plasma comercial (285I-PLA-N, Innovative Research)

3.1.4. Equipos

La etapa de RT se realizó con un termociclador SimpliAmp de Thermo Fisher Scientific. La fase de qPCR de todo el proceso de optimización de la RT-qPCR (apartado 3.2.3) se realizó con el equipo LightCycler 480II (Roche) a excepción del experimento de determinación de la temperatura de *annealing* (T_a) (apartado 3.2.3.2.a) que se realizó con el termociclador iQ5 (BioRad) el cual permite realizar gradientes de temperatura en un mismo ensayo. El estudio de hemólisis se llevó a cabo con el equipo de PCR en tiempo real QuantStudio 5 (QS5) (Thermo Fisher Scientific) (apartado 3.2.1.2.d) así como el estudio comparativo con la tecnología de referencia de Thermo Fisher Scientific (apartado 3.2.5).

Para la evaluación de la hemólisis por métodos espectrofotométricos se utilizó el equipo NanoDrop™ 1000. Para la cuantificación de los miARNs por este método se utilizó el NanoDrop One C (Thermo Fisher Scientific).

Finalmente, la especificidad de los cebadores se realizó con el equipo de Qiaxcel (*QIAxcel Advanced System*, QIAGEN).

3.1.5. Software

Los programas para el análisis de los datos que se utilizaron fueron:

- *Design and Analysis Software* v1.5.1 (QS5)
- LightCycler® 480 SW 1.5.1.
- GraphPad Prism v.8

3.2. Métodos

3.2.1. Estudio de Hemólisis

El estudio de hemólisis comprendió en primer lugar una búsqueda bibliográfica de la sensibilidad de los miARNs a hemólisis. Y, en segundo lugar, un estudio experimental (al no obtenerse datos para algunos miARNs), estudio de hemólisis controlada *in vitro*.

3.2.1.1. Búsqueda bibliográfica

Para determinar si existían datos bibliográficos sobre si los miARNs eran sensibles o no a la hemólisis se realizó una búsqueda bibliográfica en Pubmed buscando de forma booleana cada "miRNA" AND "hemolysis". Esto permitió tener unos antecedentes sobre cuán importante es establecer unos protocolos de trabajo riguroso para el manejo de las muestras y unos puntos de control de la calidad de las mismas.

3.2.1.2. Estudio de hemólisis controlada *in vitro*

3.2.1.2.a. Preparación de plasma con diferentes grados de hemólisis

Las muestras de sangre con las que se realizaron los estudios de hemólisis se obtuvieron de muestras de 2 individuos sanos procedentes del biobanco INCLIVA del Instituto de Investigación Sanitaria INCLIVA de Valencia.

La sangre periférica se obtuvo acorde al procedimiento normalizado de trabajo (PNT) del Biobanco en consonancia con las Directrices de la Organización Mundial de la Salud sobre la extracción de sangre y los Procedimientos de recogida de muestras de sangre por Venopunción de *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Para ello se utilizaron sendos tubos Vacutainer de EDTA K2 de 6 ml.

Para la preparación del plasma con diferentes grados de hemólisis se utilizó el siguiente procedimiento:

- a) Se realizó la separación del plasma de la fase de glóbulos rojos (RBCs, *red blood cells*) en el plazo de 1 hora desde la extracción de la sangre. Para ello, se utilizó una centrífuga con rotor horizontal y cabezal basculante y desactivada la función de freno. Los tubos se centrifugaron a temperatura ambiente durante 10 minutos a 1.600xg. La fase superior amarilla (plasma) se transfirió a un nuevo tubo y se centrifugó de nuevo a 2500xg a temperatura ambiente durante 15 min en una centrífuga de ángulo fijo. Se alicuotó la muestra en volúmenes de 500µL.
- b) Se tomó una alícuota de 2 µl del plasma para medir la absorbancia de la oxihemoglobina a 414 nm. El plasma se aceptó para continuar con el estudio si la absorbancia a 414 nm era menor de 0,2 (Kirschner *et al.*, 2011).
- c) La fase de RBCs se mezcló vigorosamente durante 60 segundos usando un vórtex (Appierto *et al.*, 2014)(Kirschner *et al.*, 2013).
- d) Las RBCs artificialmente hemolizadas y el plasma no hemolizado del mismo individuo se resuspendieron en diferentes proporciones completando un volumen

final de 400 µL para obtener una serie hemolítica (rango: 0-2% v/v). Para lo que se siguió el siguiente esquema:

Muestra	Componente 1 (plasma no hemolizado)	Componente 2	%Hemólisis
M1	784 µL	16 µL de RBC	2
M2	400 µL	400 µL de M1	1
M3	400 µL	400 µL de M2	0.5
M4	400 µL	400 µL de M3	0.25
M5	400 µL	400 µL de M4	0.125
M6	400 µL	400 µL de M5	0.063
M7	400 µL	400 µL de M6	0.031
M8	400 µL	400 µL de M7	0.016
M9	400 µL	400 µL de M8	0.008
M10	400 µL	400 µL de M9	0.004
M11	400 µL	-	0

Una vez preparado el plasma, se determinaron los marcadores de hemólisis por métodos espectrofotométricos y por RT-qPCR. Para ello, se generaron curvas de calibración de hemólisis con los valores de la absorbancia a 414 nm, valores de Cts, miR ratio, $2^{-(\Delta\Delta C_{tsj})}$ (eje x), y los porcentajes de RBCs conocidos (eje y).

3.2.1.2.b. Evaluación de la hemólisis mediante espectrofotometría

En la evaluación de la hemólisis por métodos espectrofotométricos se midió a partir de 2 µl de cada muestra/punto de la curva la absorbancia a 414 nm debida a la presencia de oxihemoglobina. En este estudio el criterio que se utilizó para determinar que una muestra no era hemolítica es que el valor de la absorbancia fuese <0.2 (Kirschner *et al.*, 2011).

3.2.1.2.c. Purificación de miARNs del plasma sanguíneo

La purificación de los miARNs se realizó con el kit miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen). Para ello se partió de 250µL de muestra de plasma. Todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente a excepción del paso 2 y 7 que se hicieron a 4°C. El procedimiento incluyó los siguientes pasos:

1. Se descongelan en hielo las muestras de plasma guardadas a -80°C.
2. Se centrifuga a 16,000xg durante 10 minutos para eliminar los restos celulares.
3. Se cogen 200µl de la fase superior del plasma y se pasan a nuevo tubo. Se añade 1ml de Qiazol para la lisis (5 veces el volumen de plasma).
4. Se mezcla con vórtex y se incuba la muestra a temperatura ambiente (15-25°C) durante 5 minutos.
5. Se añaden 3.5 µl de miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control (a 1.6×10^8 copies/µl) y se mezcla bien.
6. Se adicionan 200µl de cloroformo (igual volumen que de muestra de partida) y se agita en vórtex durante 15 segundos hasta homogeneizar las fases. Se incuba a temperatura ambiente durante 3 minutos.

7. Se centrifuga a 12,000xg durante 15 minutos.
8. Se transfieren 600µL la fase acuosa superior a un nuevo tubo con cuidado de no mezclar las tres fases apreciables: fase acuosa superior incolora que contiene ARN (miARNs), interfase blanca y fase orgánica rosa inferior.
9. Se añaden 900µL etanol absoluto a cada tubo a la fase acuosa y se mezcla pipeteando (1.5 veces el volumen de la fase acuosa).
10. Se pasan 700µL de la solución resultante del paso previo a una columna RNeasy MinElute spin y se centrifuga a 8000xg durante 15 segundos. Se descarta el eluido y se repite este paso.
11. Se añaden 700µL de Buffer RWT a cada columna y se centrifuga durante 15s a 8,000xg. Se descarta el eluido.
12. Se añaden 500µL de Buffer RPE a la columna y se centrifuga 15s a 8,000xg. Se descarta el eluido.
13. Se adicionan 500µL de etanol al 80% a cada columna y se centrifugan a 8,000xg durante 2 minutos. Se descarta el tubo colector con el eluido
14. Se coloca la columna sobre un nuevo tubo de 2 mL. Se destapa la columna y se centrifuga a 10,000xg durante 5 min para secar la membrana. Se descarta tubo colector con eluido.
15. Se coloca la columna sobre un nuevo tubo de recolección y se añaden 25µL de agua libre de ARNasas directamente en el centro. Se centrifuga 1 minuto a 10,000xg.
16. El eluido se vuelve a pasar por la columna y se centrifuga 1 minuto a 10,000xg.
17. El ARN (conteniendo miARNs y otros ARNs de pequeño tamaño) se cuantifica por espectrofotometría) y se guarda a -80°C hasta su uso.

3.2.1.2.d. Evaluación de la hemólisis mediante RT-qPCR

Una vez extraído el ARN se evaluó otro marcador de hemólisis basado en el cálculo de ΔCt miR-23-miR-451 (miR ratio) (Blondal *et al.*, 2013). Para ello, la RT-qPCR se llevó a cabo con los componentes de Thermo Fisher Scientific evaluándose los miARNs miR-27a-5p, miR-122-5p, miR-223-5p, miR-1306-3p, miR-191-5p, miR-23a-3p y miR-451a. La RT se preparó como se indica en la tabla 8, y se aplicó el programa de la tabla 9. Para la qPCR los componentes se añadieron en el orden que indica la tabla 10 y se aplicó el programa de la tabla 11. Con los valores de Ct obtenidos en la RT-qPCR, se calculó ΔCt miR-23a-miR-451a (Blondal *et al.*, 2013). El criterio que se siguió fue ΔCt (miR-23-miR-451): 9-11 baja hemólisis; 11-14 hemólisis media; > 14 hemólisis alta (Zhelankin *et al.*, 2020).

Finalmente, el último indicador de hemólisis estudiado fue la expresión de los miARNs a través del método $2^{(-\Delta\Delta Ct_{sj})}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Para ello se siguieron los siguientes pasos:

- a) Se calculó el ΔCt para cada muestra (s), y para cada réplica (j) del estudio de la siguiente manera:
 $\Delta Ct_{sj} = Ct_{sj} - Ct_{sj\text{ REF}}$, donde $Ct_{sj\text{ REF}}$ es el Ct de miARN de referencia miR-23a
Nota: Los valores de ΔCt se usan como variable pivotal para evaluar la influencia de la hemólisis en cada miARN de interés a través de la cantidad relativa (RQ).

- b) Se calculó RQ para evaluar la relevancia del cambio de expresión en comparación con la muestra de plasma sin hemólisis, restando al valor de ΔC_{tsj} de cada muestra el ΔC_t de la muestra con 0% de hemólisis (M11) de la siguiente manera:
 $RQ_{sj} = 2^{(-\Delta\Delta C_{tsj})}$ donde $\Delta\Delta C_{tsj} = \Delta C_{tsj} - \Delta C_t$ (M11) (Pizzamiglio *et al.*, 2017)(Myklebust *et al.*, 2019a).
- c) En el análisis estadístico se compararon en cada uno de los miARNs los distintos porcentajes de hemólisis, para ello se aplicó un test no paramétrico de Kruskal- Wallis seguido de pruebas post-hoc de Dunn solo en el caso de que el test de Kruskal-Wallis arrojase diferencias estadísticamente significativas. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando el p valor < 0.05.

Tabla 8. Componentes de la master mix para la etapa de RT con tecnología Thermo Fisher Scientific.

Componentes MIX	Conc rxn	Vol (µL) Master Mix/ 10 µL rxn
Cebador (5x) &	0,2x	0,4
dNTPs 100 mM	2mM	0,2
<i>Reverse Transcriptasa Multiscribe</i> , 50 U/µL	10	2
<i>Buffer RT 10x</i>	1x	1
Inhibidor ARNasa 20 U/µL	0,25	0,125
Agua libre de ARNasas		4,275
Oligo mímico miARN		2

& Específico para cada miARN

Tabla 9. Programa de RT con la tecnología de Thermo Fisher Scientific.

Fase	Tiempo (min.)	Temperatura (°C)
1	30	16
2	30	42
3	5	85
4	∞	4

Tabla 10. Componentes de la mix para qPCR con la tecnología Thermo Fisher Scientific.

Componentes MIX	Vol (µL) Master Mix/ 10 µL rxn
<i>TaqMan Small RNA assays (20x)</i> &	0,5
<i>TaqMan Universal Master MIX II (2x)</i>	5
Agua libre de nucleasas	3,5
Muestra de cADN	1

& Específico para cada miARN.

Tabla 11. Programa de qPCR con la tecnología Thermo Fisher Scientific.

	Nº ciclos	Diana [°C]	Modo de adquisición	Tiempo [hh:mm:]	Rampa [°C/s]	Adquisición [per °C]
Activación enzima	-	95	Ninguno	00:10:00	1.6	-
Desnaturalización + Amplificación	45	95	Ninguno	00:00:15	1.6	-
		60	Ninguno	00:01:00	1.6	-

Los resultados obtenidos del equipo QS5 se analizaron con el *software* “Design and Analysis Software v1.5.1” con el ajuste automático de *baseline* y *threshold*.

3.2.2. Preparación de soluciones de oligonucleótidos de ARN: cebador de RT, Forward, Reverse, sonda y oligo mímico de los microARNs

Todos los oligonucleótidos llegaron liofilizados. El procedimiento de preparación de los oligonucleótidos se describe en el siguiente protocolo:

- Los tubos se centrifugan a 10,000xg durante 10 segundos para que todo el material caiga al fondo del mismo.
- Se abre el tubo dentro de la campana de PCR previamente descontaminada (15 minutos luz ultravioleta (UV)).
- En el caso de los cebadores de RT, F, R y sonda se añade el volumen de agua libre de ARNasas indicado en el *data sheet* para tener una concentración *stock* de 100µM, agitándose 4 minutos en vórtex.
- Se preparan las alícuotas de trabajo y se guardan a -20°C.
- El oligo mímico de miARN se reconstituye con Buffer TRIS EDTA 10mM pH 8 añadiendo el volumen necesario indicado en el *data sheet* para tener también una concentración *stock* de 100µM, agitándose un minuto en vórtex.
- Se hacen alícuotas y se guardan a -80°C para largos períodos de conservación a excepción de una de ellas que se guarda a -20°C. Se alícuota este vial (para evitar ciclos de congelación-descongelación) y se preparan soluciones de trabajo.

Evitar que dé la luz a cada una de las preparaciones. Todas las soluciones de trabajo se prepararon en tubos de baja retención de ADN/ARN.

3.2.2.1. Preparación de curvas de calibrado de oligo mímico de miARNs

A partir de la solución *stock* de 100µM de cada una de los oligo mímicos de miARN se preparó, en tubos de baja retención ADN/ARN, la curva de calibrado por diluciones seriadas. Para ello, se calculó con la herramienta *SciencePrimer.com* (<http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>) el número de copias a partir de los ng (X) y el número de pares de bases del oligo mímico (N):

$$\text{Número de copias (moléculas)} = \frac{X \text{ ng} * 6,0221 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol}}{\left(N * 340 \frac{\text{g}}{\text{mol}}\right) * 1 \times 10^9 \text{ ng/g}}$$

Dado que en este caso se trata de oligonucleótidos mímicos de miARN de simple cadena se utilizó en la fórmula 340g/mol (= 340Da), que es la masa molar de un nucleótido de ARN. Se prepararon diluciones seriadas 1:10 con agua libre de ARNasas desde el rango de 1×10^9 copias/ μ l - 1×10^1 copias/ μ l (Ma *et al.*, 2013) agitando 1 minuto en vórtex y seguido de centrifugación entre punto y punto (10,000xg durante 1 minuto). Este método de dilución entre punto y punto se aplicó a lo largo de todos los experimentos. La curva se puede preparar en base a nanogramos/ μ l o número de copias/ μ l. En este caso, para una cuantificación más precisa en la qPCR se prepararon en número de copias/ μ l, calculando finalmente el número de copias totales que se ponen en la reacción. Con esta curva se realizó el proceso de optimización de la RT-qPCR.

3.2.3. Optimización de la RT-qPCR con la plataforma LightCycler 480II (Roche)

El proceso de optimización de la RT-qPCR se realizó con la Plataforma Roche, en un proceso de 2 etapas, lo cual conlleva la optimización de la RT y de la qPCR. Esta optimización se evaluó a través de parámetros analíticos: sensibilidad, especificidad, eficiencia, precisión, LOC y LOD. Para ello se utilizaron los oligos mímicos sintéticos de los miARNs miR-122-5p, miR-223-5p, miR-1306-3p y miR-191-5p (apartado 3.1.1).

El proceso podría iniciarse indistintamente por una u otra etapa, sin embargo, la estrategia que se adoptó en este estudio fue optimizar primero la etapa de qPCR manteniendo las condiciones de RT. De este modo, se asumió una eficiencia del 100% en la RT, por lo que las variaciones en los valores de Cts serán debidos a alguna variable del proceso de qPCR (*i.e.* Ta, concentración del cebador *Forward* y *Reverse* o concentración de la sonda). En todos los experimentos se consideró un porcentaje de error en el pipeteo del 12%.

La composición de la reacción de RT, a excepción de la concentración de cebador de RT a 50 nM (tabla 12), y el programa de RT (tabla 13) fueron los recomendados por el fabricante:

Tabla 12. Componentes de la RT.

Componentes MIX	Vol 20 μ L	Concentración final
Cebador específico RT 1 μ M ^{&}	1	50nM
Transcriptor RT buffer 5x	4	1x (8 mM MgCl ₂)
Protector inhibidor ARNasa 40 U/ μ L	0,5	20U
dNTPs 10 mM each	2	1mM
Transcriptor reverse transcriptasa 20U/ μ L	0,5	10U
Agua libre de ARNasas	Csp para 20 μ L	-
Oligo mímico microARN	2	

[&]Específico para cada miARN

Tabla 13. Programa de RT recomendado por Roche.

Fase	Tiempo	Temperatura
1	30 min	55°C
2	5 min	85°C
3	∞	4°C

Por lo que respecta a la qPCR, el proceso de optimización se realizó utilizando las tecnologías de SYBR Green y de Taqman.

Tecnología SYBR Green:

Esta química permitió detectar productos inespecíficos a través de las curvas de *melting* (Sigma-Aldrich, 2008) y además obtener resultados de sensibilidad. Para ello se utilizó el kit LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) y se aplicó el programa que viene por defecto en el equipo LightCycler 480II variando la Ta a 1 minuto (Myklebust *et al.*, 2019a). Las condiciones de qPCR y el programa que se aplicó fueron los siguientes:

Tabla 14. Componentes de la qPCR con tecnología SYBR Green.

Componentes	Reacción 10 µL	Concentración final
Cebador <i>Forward</i> - 10x conc (10µM) &	0,5	0,5µM
Cebador <i>Reverse</i> - 10x conc (10µM) &	0,5	0,5µM
SYBR Green Mix (2x)	5	1x
Agua libre de ARNasas	Csp 10µL	
Muestra de cADN	2	

& Específico para cada miARN

Tabla 15. Programa de qPCR para la evaluación con SYBR Green.

Equipo	LightCycler 480 II.
Bloque y tipo de placa	384 blanca
Formato de detección	SYBR Green I/HRM Dye
Volumen de reacción (µL)	10

Nombre Programa	Ciclos	Tipo de análisis
Preincubación	1	Ninguno
Amplificación (<i>annealing</i> + extensión)	45	Cuantificación
Curva de <i>melting</i>	1	Curva de <i>melting</i>
Enfriamiento (<i>Cooling</i>)	1	Ninguno

	Diana [°C]	Modo de adquisición	Tiempo [hh:mm:]	Rampa [°C/s]	Adquisición [per °C]
Preincubación	95	Ninguno	00:05:00	4.8	-
Amplificación	95	Ninguno	00:00:10	4.8	-
	60	Único	00:01:00	2.5	-
Curva de <i>melting</i>	95	Ninguno	00:00:05	4.8	-
	65	Ninguno	00:01:00	2.5	-
	97	Continuo	-	0.11	5
Enfriamiento	40	Ninguno	00:00:30	2.5	-

Tecnología Taqman:

Por lo que respecta a la química Taqman, se utilizó para la optimización de la concentración de sonda (apartado 3.2.3.2.c), así como la validación de la qPCR (apartado 3.2.3.2.d), la optimización de la concentración de cebador de RT (apartado 3.2.3.3), la validación de la RT-qPCR (apartado 3.2.4), estudio de ARN *input* y cADN (apartado 3.2.7) así como en el resto de

experimentos en los que se utilizan muestras de plasma y en el ensayo de funcionamiento del kit ScoliPro®. Los componentes y las concentraciones que se utilizaron fueron las siguientes (tabla 16):

Tabla 16. Componentes de la qPCR con sonda Taqman.

Componentes	Reacción 10 µL	Concentración final
Cebador <i>Forward</i> - 10x conc (10 µM) &	0.5	0.5 µM
Cebador <i>Reverse</i> - 10x conc (10 µM) &	0.5	0.5 µM
Sonda (10µM) &	0.1	0.1 µM
LightCycler 480 Probe Master (2x)	5	1x
Agua libre de ARNasas	Csp 10µL	
Muestra de cADN	2	

&Específico para cada miARN.

Por lo que respecta al programa, se utilizó el que viene por defecto para sonda Taqman en el equipo LightCycler480II (Roche) modificando la Ta a 1 minuto (tabla 17).

Tabla 17. Programa de qPCR para la evaluación con sonda Taqman.

Equipo	LightCycler 480 II.
Bloque y tipo de placa	384 blanca
Formato de detección	Mono Color Hydrolysis Probe/UPL Probe
Volumen de reacción (µL)	10

Programa	Ciclos	Tipo de análisis
Preincubación	1	Ninguno
Amplificación	45	Cuantificación
Enfriamiento	1	Ninguno

	Diana [°C]	Modo de adquisición	Tiempo [hh:mm:]	Rampa [°C/s]	Adquisición [per °C]
Preincubación	95	Ninguno	00:10:00	4.8	-
Desnaturalización +	95	Ninguno	00:00:10	4.8	-
Amplificación	60	Ninguno	00:01:00	2.5	-
Enfriamiento	40	Ninguno	00:00:30	2.5	-

3.2.3.1. Evaluación de la especificidad de cebadores

La especificidad de los cebadores se evaluó en dos tipos de ensayos por: (1) curvas de *melting* y (2) electroforesis capilar (QiAxcel de Qiagen), detectando de esta forma si se formaron dímeros durante la amplificación (Varkonyi-Gasic and Hellens, 2011)(Feng *et al.*, 2009)(Bio-Rad, 2006) (Taylor *et al.*, 2010)(Raymaekers *et al.*, 2009)(Roche, 2009)(Abdel Nour and Plaffl, 2020)(Wang and Zhang, 2012)(Schmittgen *et al.*, 2004).

3.2.3.1.a. Evaluación mediante curvas de *melting*

En la reacción RT se añadieron 10^7 y 10^5 copias de oligo mímico de ARN de cada uno de los miARNs. El resto de los componentes y el programa que se aplicó fueron los que se indican en la tabla 12 y 13, respectivamente (apartado 3.2.3). El producto de cADN obtenido se utilizó, para evaluar la curva de *melting* en una PCR con SYBR Green y para analizar los productos de PCR en Qiaxcel. Tanto la reacción de RT como la qPCR se hicieron por duplicado (Bustin *et al.*, 2009)(Bustin *et al.*, 2010), oligo mímico y blanco de RT (NTC, *No Template Control*), el cual contenía todos los componentes de la MIX, pero se sustituyó la muestra por agua. La qPCR se realizó según la tabla 14 y 15 de la tecnología SYBR Green (apartado 3.2.3).

Las curvas de *melting* de los cuatro replicados, correspondientes a un punto (ej. 10^7 copias, 10^5 copias o NTC) procedentes de dos RT (RT1 y RT2) se analizaron para evaluar la especificidad de la amplificación.

3.2.3.1.b. Evaluación por electroforesis capilar

El producto de cADN se amplificó aplicando dos estrategias distintas:

- PCR con la master mix FIREPol (Solis BioDyne, 7.5mM MgCl₂), siguiendo las recomendaciones indicadas en el *data sheet* (Condición 1) y para las características del amplicón. Se escogió el programa y concentraciones descrito en las tablas 18 y 19, respectivamente.
- PCR con Probe Master mix (Roche), con los componentes de la tabla 16 (apartado 3.2.3) pero sustituyendo la sonda por agua libre de ARNasas ya que el producto va a ser visualizado en un Qiaxcel. El programa de qPCR que se aplicó fue el descrito en la tabla 17 para Taqman pero sin adquisición (apartado 3.2.3).

Tabla 18. Programa de qPCR.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min.	1
Desnaturalización	95	30seg.	45
<i>Annealing</i>	60	60seg.	
Elongación	72	40seg.	
Final de la elongación	72	5 min.	

Tabla 19. Componentes mix de qPCR utilizando como master mix FIREPol.

Componentes	Reacción 20 µL	Concentración final
Cebador <i>Forward</i> - 10x conc (10µM) &	0,6	0,3µM
Cebador <i>Reverse</i> - 10x conc (10µM) &	0,6	0,3µM
FIREPol Master Mix (5x)	4	1x
Agua libre de nucleasas	Csp 20µL	
Muestra de cADN	2	

&Específico para cada miARN

Dos µL el producto de PCR se diluyeron con 8 µL de *QX RNA Dilution buffer*, y se cargaron en el cartucho, aplicándose el programa indicado en la tabla 20.

Tabla 20. Protocolo de electroforesis capilar aplicado para el estudio del tamaño del producto de PCR de los miARNs estudio.

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

Los criterios de calidad utilizados para determinar si los cebadores diseñados para los miARNs eran específicos fueron: (1) la forma de la curva de disociación, tiene que tener un único pico, estrecho, bien definido (Abdel Nour and Plaffl, 2020)(Feng *et al.*, 2009)(Sigma-Aldrich, no date) (Bio-Rad, 2006), (2) la Tm del amplicón debe de ser reproducible en cada experimento (Abdel Nour and Plaffl, 2020), y tener el tamaño (nº pb) esperado correspondiente al producto de amplificación (Raymaekers *et al.*, 2009)(Feng *et al.*, 2009)(Taylor *et al.*, 2010)(Bio-Rad, 2006) (3) no observar dímeros de cebadores, o pocos en los controles negativos (NTC y Blanco de qPCR (BqPCR)(Sigma-Aldrich, no date)(Feng *et al.*, 2009)(Bio-Rad, 2006).

3.2.3.2. Optimización de la qPCR

3.2.3.2.a. Optimización de la Ta

La aproximación que se siguió en este experimento fue fijar unas condiciones de RT (tabla 12 y 13 apartado 3.2.3) y de qPCR (tabla 21 y tabla 22), incluyendo la concentración de cebadores y con estas condiciones se seleccionó la temperatura óptima.

Esta aproximación requiere un instrumento que permita correr simultáneamente en una misma reacción varias Ta (Sigma-Aldrich, no date)(Taylor *et al.*, 2010)(Bio-Rad, 2006)(Abdel Nour and Plaffl, 2020). El termociclador iQ5 (Bio-Rad) elegido permite hacer un barrido de 8 Ta dentro de una misma corrida.

- a) En primer lugar se establece el rango de temperaturas a estudiar y que debe comprender temperaturas por encima y por debajo de la Tm de los cebadores F y R del miARN estudio (Bio-Rad, 2006)(Taylor *et al.*, 2010). En concreto (Abdel Nour and Plaffl, 2020) recomienda que el rango de temperaturas abarque temperaturas de +/- 6 °C la Tm de los cebadores de qPCR. En la tabla 23 se resumen las Ta de los cebadores definitivos de los miARNs estudio, es por ello qué, en base a este criterio el rango de temperaturas a estudiar debe de estar entre 50-65°C, aproximadamente.
- b) La optimización de la Ta solamente se estudió con el miR-191-5p, ya que la Tm de los cebadores del resto de miARNs fue similar. Por ello, y puesto que, además, este es un miARN endógeno del plasma y que se va a utilizar como miARN de referencia, es el candidato óptimo para llevar a cabo esta evaluación y extrapolar los resultados obtenidos al resto de miARNs.

- c) El intervalo de temperaturas a estudiar se introduce en el *subset* del experimento, de manera que el *software* del equipo proporciona varios conjuntos de rangos de temperaturas. En este experimento se escoge el conjunto que incluye las siguientes temperaturas: 65, 64.2, 62.7, 60.3, 57, 54.6, 53, 52 °C.
- d) La Ta óptima se determina considerando: (1) el menor valor de Ct; (2) especificidad de los cebadores (un único pico en las curvas de *melting*) y la no formación de productos inespecíficos en el NTC y BqPCR; y 3) reproducibilidad en los replicados (Abdel Nour and Plaffl, 2020).

Tabla 21. Componentes mix qPCR.

Componentes	Reacción 12.5 µL	Concentración final
Cebador <i>Forward</i> - 10x conc (10µM) &	0,625	0,5µM
Cebador <i>Reverse</i> - 10x conc (10µM) &	0,625	0,5µM
SYBR Green Mix (2x)	6,25	1x
Agua libre de ARNasas	Csp 12,5µL	
Muestra de cADN	2	

&Específico de cada miARN

Tabla 22. Programa qPCR.

Equipo	iQ5 (BIO-RAD)
Bloque y tipo de placa	96 negra
Formato de detección	SYBR Green
Volumen de reacción (µL)	12.5

Nombre	Ciclos	Tipo de análisis
Preincubación	1	Ninguno
Amplificación (<i>annealing</i> + extensión)	45	Cuantificación
Curva de <i>melting</i>	211	Curva de <i>melting</i>
Enfriamiento (<i>Cooling</i>)	1	Ninguno

	Diana [°C]	Modo de adquisición	Tiempo [hh:mm:]	Adquisición [per °C]
Preincubación	95	Ninguno	00:02:30	-
Amplificación (<i>annealing</i> + extensión)	95	Ninguno	00:00:10	-
	52-65	Tiempo real	00:01:00	-
Curva de <i>melting</i>	55-97	Curva de <i>melting</i>	00:01:00	Increase set point temperature after cycle 2 by 0,2 °C
Enfriamiento (<i>Cooling</i>)	40	Ninguno	00:00:30	-

- e) La distribución de las Ta en el equipo iQ5 se realiza por filas. Debido a esta limitación, solo se pueden realizar, por cada Ta, dos replicados técnicos/punto n° copias oligo

mímico y uno único para el NTC y BqPCR. Por tanto, el diseño definitivo de la placa es el que se muestra en la figura 7.

Tª (°C)	96 Pocillos	RT 1		RT 2		RT 1		RT 2		RT 1	RT 2	RT 1	RT 2
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
65	A	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	NTC	NTC	BqPCR	BqPCR
64,21	B	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	NTC	NTC	BqPCR	BqPCR
62,67	C	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	NTC	NTC	BqPCR	BqPCR
60,28	D	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	NTC	NTC	BqPCR	BqPCR
56,98	E	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	NTC	NTC	BqPCR	BqPCR
54,63	F	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	NTC	NTC	BqPCR	BqPCR
53,02	G	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	NTC	NTC	BqPCR	BqPCR
52	H	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	NTC	NTC	BqPCR	BqPCR

Figura 7. Diseño placa PCR para determinación de la Ta óptima. RT1: replicado 1 de RT; RT2: replicado 2 de RT.

Tabla 23. Ta del cebador de RT, Forward y Reverse de todos los diseños de cebadores para cada uno de los miARN estudio.

miARN	Cebador de RT (°C)	Forward (°C)	Reverse (°C)
Hsa-miR-122-5p	83.2	56.6	55.9
Hsa-miR-223-5p	82.1	58.5	55.5
Hsa-miR-1306-3p	83.5	56.7	55.5
Hsa-miR-191-5p	84.5	56.7	55.8
Cel-miR-39-3p	82.1	57.1	55.8

3.2.3.2.b. Optimización de la concentración de cebadores F y R

Determinada la Ta, se procedió a determinar la mejor combinación de cebadores F y R para los 4 miARNs de estudio. Los manuales técnicos del equipo recomiendan que para el proceso de optimización de cebadores se utilicen concentraciones equimolares de 0.5µM (Roche, 2009). Puesto que cada uno de los miARNs en estudio, tiene una expresión distinta en el plasma, se estudiaron 3 concentraciones de cada cebador. Las concentraciones que se estudiaron fueron: 0.25µM, 0.5 µM y 1µM (Ding *et al.*, 2012)(Sigma-Aldrich, no date)(Mei *et al.*, 2012)(De Ronde *et al.*, 2017)(Balcells, Cirera and Busk, 2011)(Kramer, 2011)(Express, 2009)(Chen *et al.*, 2005)(Mei *et al.*, 2012)(Varkonyi-Gasic and Hellens, 2011)(Feng *et al.*, 2009)(Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007)(applied biosystem, 2005)(TaqMan® Gene Expression Assays Protocol For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures, 2010)(Japan, 2004).

Se escogió la combinación de cebadores con la que se obtuvo menor valor de Ct, menor variabilidad en los replicados manteniéndose la curva sigmoideal (valores más altos de fluorescencia) y sin amplificación en el NTC (Sigma-Aldrich, no date)(Sigma-Aldrich, 2008). Por tanto, la combinación de cebadores más sensible y reproducible será aquella que dé un único pico, con un punto máximo de fluorescencia cuando esté presente el *target* y no se observe amplificación en el NTC. Si en todas las combinaciones de cebadores se observa un pico en las curvas *melting* en ausencia de *template*, y este “no producto” tiene una Tm menor que la

correspondiente al producto diana, se selecciona la combinación en la que se observe el menor pico en este no-producto. Probablemente, este pico sea el resultado de dímeros de cebadores (Sigma-Aldrich, 2008).

Para hacer el estudio de optimización de la concentración de los cebadores se utilizó el siguiente procedimiento:

- a) Se diseña una plantilla y una matriz de cebadores para un total de 9 combinaciones distintas. Este experimento y todos los que se describen de aquí en adelante, se realizan triplicados en la qPCR.
- b) Para la RT los componentes se añaden en el orden que indica la tabla 12 (apartado 3.2.3) y se aplica el programa recomendado por Roche tabla 13 (apartado 3.2.3).
- c) En el caso de la qPCR, para que las condiciones sean lo más homogéneas posible, se prepara, por un lado, una MIX conjunta para todas las combinaciones de cebadores que se van a estudiar, que contiene los componentes comunes (agua y SYBR Green) (Tabla 24).

Tabla 24. Componentes comunes a todas las condiciones de F y R estudiadas.

Componentes	Reacción 10 μ L	Concentración final
Cebador Forward - 10x conc (10 μ M) ^{&}	-	-
Cebador Reverse - 10x conc (10 μ M) ^{&}	-	-
LightCycler 480 Probe Master (2x)	5	1x
Agua libre de ARNasas	1	
Muestra de cADN	2	

[&] Específico para cada miARN

- d) Por otro lado, a partir de las soluciones *stock* de 10 μ M de F y R, se preparan por dilución 1:2 la solución de 5 μ M y a partir de ella, solución de F y R 2.5 μ M. A continuación, se preparan a partir de ellas, añadiendo igual volumen de F y R, 9 pre-mixes, tal como muestra en la tabla 25 y tabla 26.

Tabla 25. Combinaciones de F y R.

Reverse (μ M)	Forward (μ M)		
	2.5	5	10
2.5	Premix 1	Premix 4	Premix 7
5	Premix 2	Premix 5	Premix 8
10	Premix 3	Premix 6	Premix 9

Tabla 26. Concentraciones de F y R finales.

Componentes	Reacción 10 μ L	Concentración final (μ M)
Premix 1-9 (F y R 2.5-5-10 μ M) ^{&}	2	0.25-0.5-1
LightCycler 480 Probe Master (2x)	-	-
Agua libre de ARNasas		
Muestra de cADN		

[&] Específico para cada miARN

- e) Una vez preparadas todas la MIX y pre-mixes se añade la MIX a todos los pocillos, los 2 μL de la pre-mix de F y R correspondiente y la muestra de cADN o agua (para el BqPCR) (Tabla 26).
- f) Se aplica el programa de la tabla 15 (apartado 3.2.3), con Ta optimizada.
- g) En el análisis estadístico se aplica, para cada uno de los miARNs y condiciones, el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y a continuación la prueba post-hoc de Dunn solo en el caso de que con el test de Kruskal-Wallis se obtuviesen diferencias estadísticamente significativas. Se consideran estadísticamente significativas las diferencias entre grupos cuando el p valor < 0.05 .

3.2.3.2.c. Optimización de la concentración de sonda

La optimización de la concentración de sonda se llevó a cabo con la combinación de los cebadores y la Ta óptima. Por tanto, a partir de este punto, ya no se utilizó como Master Mix de reacción en la qPCR el SYBR Green sino la Probe Master Mix (Roche).

El criterio que se siguió para determinar la concentración óptima de sonda es aquella que permita la detección más sensible con la mejor reproducibilidad de los replicados (Sigma-Aldrich, no date). La RT se preparó según las indicaciones descritas en la Tabla 12 y aplicando el programa recomendado por Roche, tabla 13 (apartado 3.2.3).

Las concentraciones de sonda que se estudiaron fueron: 0.1 μM , 0.2 μM y 0.3 μM (Chen *et al.*, 2005)(Express, 2009)(Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007)(Kramer, 2011)(Roche, 2009)(Sigma-Aldrich, no date)(Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007)(applied biosystem, 2005)(*TaqMan*® *Gene Expression Assays Protocol For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures*, 2010)(Japan, 2004). Por ello, se preparó para cada miARN tres Masters Mix, cada una con una concentración de sonda distinta. Los componentes se añadieron en el orden que aparece en la tabla 16 (apartado 3.2.3) variando el volumen de sonda y de agua en base a la concentración de sonda de cada condición y aplicándose el programa de la química de Taqman (tabla 17, apartado 3.2.3). Se aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post-hoc de Dunn solo en el caso de que con el test de Kruskal-Wallis se obtuviesen diferencias estadísticamente significativas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando p valor < 0.05 .

3.2.3.2.d. Validación de qPCR

Una vez optimizados todos los parámetros de la qPCR, el paso siguiente fue la validación de esta etapa. Con las condiciones de la Ta y las concentraciones de cebadores F y R, así como la concentración de sonda optimizadas, se procedió a la validación de la qPCR. La forma más efectiva de evaluar el rendimiento de un ensayo es a través de una curva de calibrado o curva estándar preparada por diluciones seriadas de *template* (Bustin *et al.*, 2009) (Raymaekers *et al.*, 2009)(Roche, 2009)(Bio-Rad, 2006) (Kralik and Ricchi, 2017a)(Taylor *et al.*, 2010).

La estrategia que aquí se siguió fue retrotranscribir un único punto, cantidad fija de oligo mímico para cada uno de los miARNs, y a partir del producto de cADN obtenido, se preparó una curva de calibrado por diluciones seriadas. De forma detallada, la RT se preparó tal como se indica en

la tabla 12 (apartado 3.2.3) y aplicando el programa recomendado por Roche (tabla 13, apartado 3.2.3). Con el cADN obtenido de retrotranscribir en el rango de 10^8 copias de cada uno de los oligos mímicos, se preparó la curva de calibrado por diluciones seriadas 1:10, con agua libre de ARNasas, de este cADN hasta 10^3 copias totales. Esta recta de calibrado, formada por 5 puntos, comprendió las cantidades esperadas del *target* en las muestras reales. El objetivo de este experimento no fue determinar hasta dónde se llegaba a cuantificar, sino establecer si el ensayo estaba o no optimizado. Para la qPCR se añadieron los componentes, con sonda y cebadores optimizados y se aplicó el protocolo de qPCR con la Ta optimizada (tabla 16 y 17, apartado 3.2.3).

Para evaluar si la qPCR estaba optimizada se procedió tal y como se describe a continuación:

- a) Se realizan 3 RT-qPCR. En la qPCR se realiza de cada punto tres replicados técnicos, de manera que se obtiene un total de 9 valores de Ct por cada punto de la recta de calibración. En la evaluación de ensayos de RT-qPCR es crítico usar como mínimo tres replicados técnicos por cada dilución (Raymaekers *et al.*, 2009)(Sigma-Aldrich, no date) (Kevin Kelnar *et al.*, 2014)(Taylor *et al.*, 2010).
- b) Se evalúan los valores de Ct obtenidos en los ensayos de RT-qPCR. Para ello, el *software* del equipo LightCycler480II, LightCycler® 480 SW 1.5.1., muestra el resultado de los valores de Ct (eje Y) respecto al log de número de copias de *template* (eje X) estableciéndose una línea de regresión. Al observar cómo varía el Δ Ct (diferencia de Ct entre un punto de dilución y otro) se puede determinar fácilmente la calidad de la PCR. Cuando la señal es débil, correspondiente a bajas concentraciones de *input*, el Software LightCycler® automáticamente plotea “log de la concentración vs Ct” como una curva no lineal que ajusta todos los puntos en vez de una línea de regresión (pero errónea) (Roche, 2009).
- c) El análisis de los datos del LightCycler 480 II se realiza con el *baseline* y *threshold* establecidos de forma automática por el equipo (Ramon *et al.*, 2018). De esta curva de calibrado el *software* proporciona las siguientes variables de interés: pendiente de la recta, eficiencia de la PCR, constante de la recta y valor de error cuadrático medio (parámetro que refleja cómo los datos se ajustan a la línea de regresión). Puesto que el equipo no proporciona el R^2 , y recomendado por el servicio técnico de Roche, se construye una curva con la herramienta Excel, en la que se representan los valores de la variable independiente, número de copias de oligo mímico, frente a la variable dependiente, valores de Ct obtenidos del LightCycler 480II. Los puntos se unen mediante un ajuste lineal de la recta y se calcula el valor de R^2 .

En el análisis de los resultados, los criterios de calidad que se siguieron fueron los siguientes:

- **Pendiente**, se determina a partir de la ecuación de la recta de la curva estándar $y = mx + C$ (Sigma-Aldrich, no date). Como referencia, en una curva formada por diluciones 1:10 el valor de pendiente ha de ser -3.32. Sin embargo, se recomienda que debe estar entre $-3.6 < m < -3.1$ (Ramon *et al.*, 2018)(Raymaekers *et al.*, 2009)(Abdel Nour and Plaffl, 2020)(Japan, 2004). En este caso, el criterio que se aplica es valor de pendiente entre -3.92 y -2.92 (Coulter, 2012).

· **Eficiencia** entre 90-105% (Bio-Rad, 2006)(Kralik and Ricchi, 2017a). Algunos artículos y guías son más laxos por lo que el margen es mayor 90%-110% (ISO, 2019)(Raymaekers *et al.*, 2009)(Taylor *et al.*, 2010)(Badri *et al.*, 2016)(Abdel Nour and Plaffl, 2020). En referencia al punto anterior, cuando el valor de pendiente teórica es -3.32, la eficiencia es igual a 2 lo cual indica que la cantidad de producto se dobla en cada ciclo de PCR.

· **Coefficiente de correlación (R^2)** debe estar $0.99 < R^2 < 0.999$ (Raymaekers *et al.*, 2009). Aunque el criterio que se ha puesto es más estricto, la bibliografía recomienda que el valor de R^2 esté por encima de 0.99 (Ramon *et al.*, 2018)(Badri *et al.*, 2016) (ThermoFisher Scientific, 2015)(Wang and Zhang, 2012)(Sigma-Aldrich, no date)(Hunter *et al.*, 2017)(applied biosystem, 2008) o 0.98 (Kralik and Ricchi, 2017a)(Taylor *et al.*, 2010)(Bio-Rad, 2006)(Coulter, 2012). El coeficiente de correlación es una medida de cómo los datos se ajustan al modelo y cómo los datos se ajustan a la recta, lo cual está influenciado por la precisión del pipeteo y por el rango del ensayo (Sigma-Aldrich, no date)(Bio-Rad, 2006).

Para el cálculo de estos parámetros de calidad, se descartó cuando fue necesario cualquier replicado que se diferenció 0.5 Cts del resto. Además, para dar por bueno el ensayo, la muestra debía de tener una curva de amplificación sigmoidea y no observarse amplificación en el NTC y BqPCR.

3.2.3.3. Optimización de la concentración de cebador de RT

Una vez optimizada la etapa de qPCR, se diseñó un experimento, fijando las condiciones óptimas de qPCR en el apartado 3.2.3.2.d, con el objetivo de determinar las mejores condiciones de la RT en términos de concentración óptima de cebador RT. Con estas condiciones se evaluó si el ARN de cerebro contenía los miARNs de interés, y se comparó la influencia de la matriz, agua y ARN de cerebro en la RT. Para poder establecer estas comparaciones se aplicó un test no paramétrico, test de Kruskal-Wallis seguido de pruebas post-hoc de Dunn solo en el caso de que el test de Kruskal-Wallis arrojase diferencias estadísticamente significativas. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando p valor < 0.05 .

En el análisis de optimización de la etapa de RT se utilizó el siguiente procedimiento:

- a) Cada uno de los miARNs de interés se estudia individualmente en dos matrices en un mismo experimento, esto es, matriz agua y de ARN. Como matriz de ARN se utiliza FirstChoice® Human Brain Total RNA. A partir de la solución *stock* de 1000ng/ μ L de este ARN, se prepara una disolución de trabajo a 25ng/ μ L. A 100ng de este ARN, se le adicionan 10^7 copias de oligo mímico de los miARNs en estudio. En el caso de agua, se le añade igual número de copias.
- b) Las concentraciones estudiadas de cebador de RT son 50nM (Czimmerer *et al.*, 2013)(Chen *et al.*, 2005)(Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007)(Varkonyi-Gasic and Hellens, 2011), 500nM y 1000nM (Roche, 2017). Además, en el caso del miR-1306-3p, en base a los resultados obtenidos en el experimento de especificidad llevado a cabo a través de

curvas de *melting* y análisis por Qiaxcel, se evalúa también la concentración de cebador de RT de 25nM (Kramer, 2011)(Tang *et al.*, 2006).

- c) Cada una de las concentraciones de cebadores de RT se estudia por duplicado, un replicado corresponde a la matriz en agua y el otro a la matriz de ARN, con su correspondiente NTC. El cADN obtenido se utiliza directamente en la qPCR, realizándose triplicados. En la qPCR, se utilizan los componentes de la tabla 16 y se aplica el programa de la tabla 17 (apartado 3.2.3).

3.2.4. Validación de la RT-qPCR en la plataforma LightCycler 480II (Roche)

Al igual que en la validación de la qPCR, la validación de la RT-qPCR también se llevó a cabo a través de una curva de calibrado.

En el caso del miARN de referencia, miR-191-5p, se retrotranscribieron los puntos que comprenden el rango de 10^9 copias- 10^3 copias totales de oligo mímico del miARN, rango en el que se espera encontrar este miARNs. En el caso del resto de miARNs, miR-122-5p, miR-223-5p y miR-1306-3p, se retrotranscribieron los puntos que comprenden el rango de 10^8 copias - 10^2 copias. En la qPCR, se siguieron dos estrategias: (1) amplificación directa del cADN obtenido de los puntos indicados anteriormente y (2) dilución 1:10 del producto de cADN obtenido de cada uno de los puntos. De esta forma, se incluyeron 6 puntos en ambos experimentos en el mismo rango: 10^8 copias - 10^3 copias en el miARN de referencia, y 10^7 hasta 10^2 copias para los miARNs del algoritmo.

Se hicieron 6 RT-qPCR a partir de los 6 puntos con distinto número de copias que componen las curvas, y se evaluaron triplicados de cada uno de los puntos en la qPCR. Se analizaron los parámetros de calidad de la PCR, entre ellos:

- **Pendiente** debe estar entre -3.3 y -4.05 (Coulter, 2012)(Roche, 2009).
- **Eficiencia de la reacción** mayor a 85% (>1.7) (Roche, 2009)(De Ronde *et al.*, 2017).
- **(R²)** mayor a 0.98 (Kralik and Ricchi, 2017a)(Bio-Rad, 2006)(Taylor *et al.*, 2010)(Coulter, 2012)(Japan, 2004).
- **Linealidad**, rango dinámico 6 puntos (10^8 copias- 10^3 copias y 10^7 copias- 10^2 copias) (ThermoFisher Scientific, 2015)(Feng *et al.*, 2009)(Wolfinger *et al.*, 2018)(Bustin *et al.*, 2009)(Kralik and Ricchi, 2017b)(Roche, 2009)(Abdel Nour and Plaffl, 2020).

Cumpliendo estos requisitos se calcularon los siguientes parámetros analíticos:

- **LOC y el LOD** (Kelnar, Heidi J. Peltier, *et al.*, 2014)(Shrivastava and Gupta, 2011)(Wolfinger *et al.*, 2018).
- **Precisión.** Repetitividad (variación intraensayo) y reproducibilidad (variación interensayo) (Kralik and Ricchi, 2017a)(Guía Eurachem. La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos. Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados, 2016)(Bustin *et al.*, 2009).

Al igual que en el apartado 3.2.3.2.d, para dar por bueno el ensayo, la muestra tenía una curva de amplificación sigmoidea y no se observó amplificación en el NTC y BqPCR.

3.2.4.1. Condiciones de la RT-qPCR en equipo LightCycler 480II (Roche)

La RT-qPCR se realizó con las condiciones optimizadas (tabla 12 y 13 para la RT y tabla 16 y 17 para la qPCR, apartado 3.2.3). Tal como se detalla en el apartado *Validación qPCR* (3.2.3.2.d), el *software* LightCycler® representa de manera automática el log cantidad en número de copias frente a los valores de Ct, obteniéndose de cada una de las curvas el valor de la pendiente, la eficiencia y el error. Para el cálculo de R² se siguió el mismo procedimiento indicado en el apartado validación de qPCR, pero ajustando los puntos a una curva polinómica de grado dos.

3.2.4.2. Procesamiento de datos para el cálculo de los parámetros analíticos

De los datos crudos de cada una de las curvas de calibrado se calculó para cada uno de los puntos el promedio de Cts de los tres replicados. En base a la eficiencia obtenida se eliminó, si fue necesario, el replicado cuyo valor de Ct excedió el máximo permitido (De Ronde *et al.*, 2017), tal como se describe en la tabla 27, volviéndose a calcular, si era el caso, los parámetros analíticos sin el punto *outlier*.

Tabla 27. Rango máximo aceptable en los replicados dependiendo de la media de los valores de Ct. Los valores son las diferencias máximas aceptables de Ct entre los replicados (valor mínimo establecido en 0.5). Nótese que el rango depende del valor de la eficiencia de la PCR y de la media de los valores de Ct de los replicados (Fuente: (De Ronde *et al.*, 2017)).

Eficiencia PCR	Media replicados Ct										
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
1.6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.7	0.8	1.1	1.4	1.7	2.2	2.9
1.7	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6	0.8	1.1	1.5	1.9	2.5
1.8	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.7	0.9	1.2	1.7	2.3
1.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.8	1.1	1.5	2.1
2.0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.7	0.9	1.3	1.9

A partir de los 6 replicados de cada uno de los miARNs se calculó el promedio de R², el valor de la pendiente promedio y la eficiencia promedio proporcionados por el *Software* LightCycler® 480 SW 1.5.1. La variación de cada uno de estos parámetros en las seis curvas se expresó como porcentaje de CV.

3.2.4.3. LOC y LOD

El LOC y el LOD se calculó para cada una de las plataformas utilizadas. Cuando no se observó amplificación, indeterminado (Ct >40 en el equipo LightCycler 480II) tanto en los NTCs como en las muestras, se asignó para los cálculos Ct= 40, ya que valores por encima de 40 implican baja eficiencia en la reacción y generalmente no se reportan (Laamiri *et al.*, 2018)(Wolfinger *et al.*, 2018). Además, fue necesario realizar este ajuste ya que se necesita un valor de Ct para calcular, en base al método que se eligió, el LOC y el LOD.

El LOD, se define como el valor de Ct más alto que se puede distinguir con seguridad del valor de Ct de ruido de fondo generado por el NTC. El LOD se calculó de la siguiente manera: $LOD = Ct_{NTC} - \Delta 1$ en el que $\Delta 1 = (3.3 \times \sigma) / -S$, donde σ es la desviación estándar de los valores de Ct de las réplicas de NTC y S es la pendiente de la curva estándar. El LOC específico de PCR, se define como el valor de Ct más alto para el que la cuantificación se puede distinguir con seguridad del valor de Ct del ruido de fondo generado por el NTC. El LOC se determinó de la siguiente manera: $LOC = Ct_{NTC} - \Delta 2$ en el que $\Delta 2 = (10 \times \sigma) / -S$, σ es la desviación estándar de las réplicas de NTC y S es la pendiente de la curva estándar (Kevin Kelnar *et al.*, 2014)(Shrivastava and Gupta, 2011).

El valor de LOC y de LOD obtenidos se sustituyeron en cada una de las ecuaciones de las 6 rectas de las curvas de calibrado, obteniéndose el número de copias. Finalmente, se calculó el promedio en número de copias de las seis curvas de calibrado.

3.2.4.4. Cálculo de LOC en base al *threshold*

El cálculo de LOC también se llevó a cabo a través del método descrito por Wolfinger *et al.* (Wolfinger *et al.*, 2018) basado en la configuración del *threshold*, en el cual, se establece un umbral de señal determinado por los NTC en la RT-qPCR.

En este caso, a diferencia del cálculo llevado a cabo en el apartado anterior, cuando el NTC no amplificó, el valor de Ct no se modificó a Ct=40, ya que este método de hecho se basa, como se describirá a continuación, en la aplicación de un cálculo u otro ateniendo a si el NTC es indeterminado o no. Puesto que, de cada miARN había un total de 6 curvas de calibrado, se asumió que el NTC era indeterminado, cuando no era posible identificarlo en al menos 3 de las 6 curvas de calibrado.

La figura 8 muestra el flujograma para calcular el LOC en diferentes escenarios de la RT-qPCR. En el primer nodo de este árbol, la detección o no del NTC determina la decisión a tomar siguiendo el flujograma. En caso de detección del NTC se resta 3.32 Cts al valor de Ct promedio de los NTCs (asumiendo que el producto se dobla en cada ciclo, así se obtiene el valor de NTC +10). El LOC se define como la concentración más baja medida de la curva de calibrado con un promedio de Ct menor que el NTC +10 pero más alto que el valor de Ct del siguiente punto de la curva de calibrado, es decir, el punto de la curva con una Ct más cercana al valor de NTC +10 es el LOC.

En caso de no detección se llega al segundo nodo de decisión, si además de no tener valor el NTC tampoco lo tienen otros puntos de la curva de calibrado, se define como "baseline noise" el punto más alto de la curva (menor cantidad de analito) con Ct indeterminado. La concentración de este punto se multiplica por 10 y se define el LOC como el punto medido más cercano a este valor.

En el tercer caso, si el NTC es indeterminado, pero sí se detectan todos los puntos estudiados de la curva de calibrado, se asume que el siguiente punto de la curva (que no se ha medido) es el límite de respuesta a la señal. Se multiplica por 10 esta concentración de manera que el LOC es la concentración medida de la curva de calibrado más cercana a este valor.

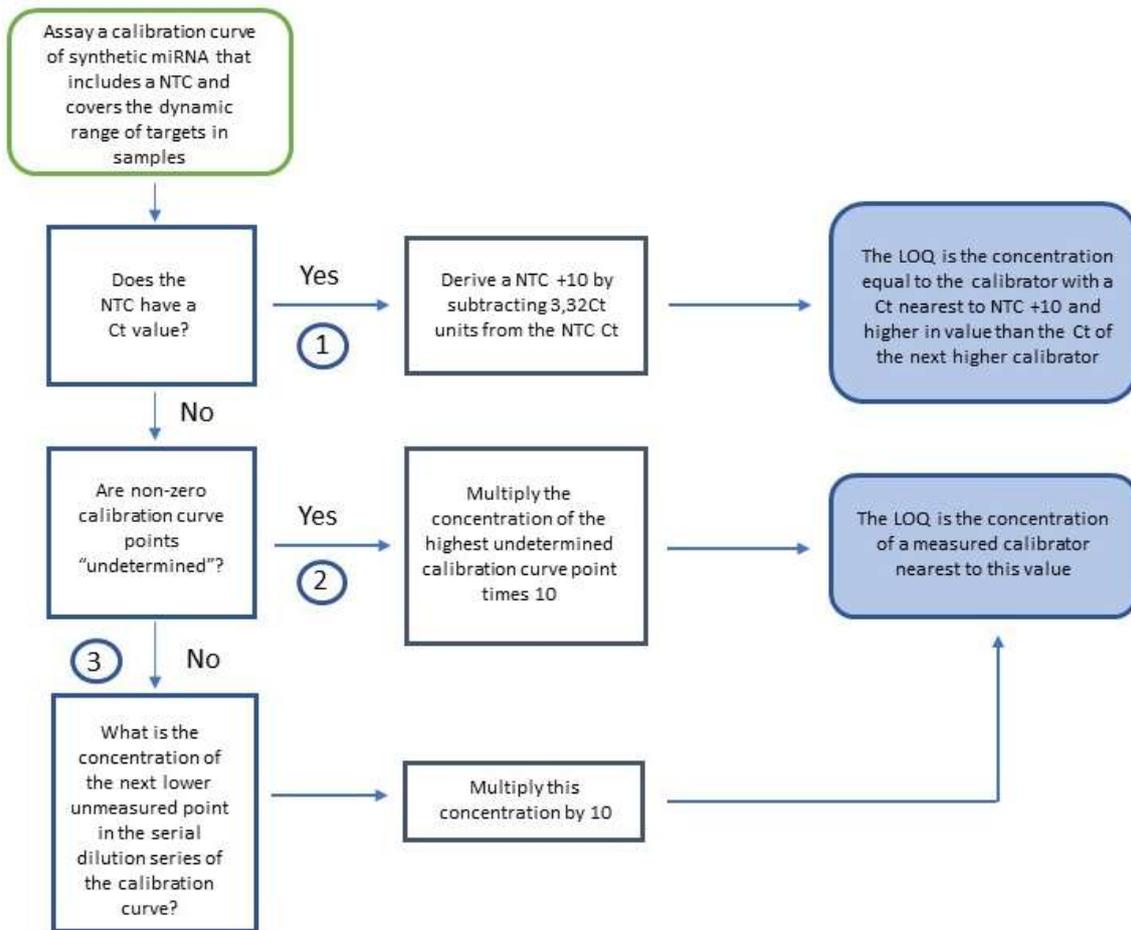


Figura 8. Workflow para la determinación de LOC basadas en el ruido de fondo. Modificada de (Wolfinger *et al.*, 2018)

3.2.4.5. Variación Intraensayo (repetitividad)

Para evaluar el error intraexperimental de las curvas de calibrado obtenidas en el proceso de validación de la RT-qPCR en la plataforma Roche LightCycler 480 II, se utilizaron los valores de Ct de cada uno de los puntos de las seis curvas de calibrado de cada miARN en las que el cADN se había diluido 1:10. Estas curvas deben ser realizadas por el mismo operador (Bustin *et al.*, 2009)(Kralik and Ricchi, 2017a)(K Kelnar *et al.*, 2014). Para ello se calculó, para cada miARN, el promedio de Ct de los triplicados de cada uno de los puntos de las seis curvas de calibrado.

A partir de este promedio, la variación intraexperimental se expresó como la SD de los triplicados de cada punto de la curva estándar (Kralik and Ricchi, 2017a)(Bustin *et al.*, 2009)(K Kelnar *et al.*, 2014).

3.2.4.6. Variación interensayo (reproducibilidad)

Para cada miARN y punto de la curva de calibrado, se calculó el promedio de SD de las 6 curvas de calibrado realizadas por el mismo operario en distintos días. Los resultados se expresaron, al igual que la repetitividad, como SD (Le Carré, Lamon and Léger, 2014)(Hue *et al.*, 2016).

3.2.5. Evaluación de la RT-qPCR en equipo QS5 (Thermo Fisher Scientific)

El estudio comparativo del funcionamiento de la RT-qPCR en Roche se hizo *versus* la plataforma de referencia de Thermo Fisher Scientific. Para ello se utilizaron los mismos puntos de la curva de calibrado de los miARNs estudiados con el equipo Roche LightCycler 480II con el objetivo de comparar la sensibilidad en ambas plataformas. Los componentes de la RT y el programa fueron los descritos en la tabla 8 y 9 (apartado 3.2.1.2.d).

Siguiendo la misma estrategia, el cADN obtenido se amplificó directamente en la qPCR y se diluyó 1:10. Esta reacción de qPCR se preparó tal como se indica en la tabla 10 y se aplicó el programa de la tabla 11 (apartado 3.2.1.2.d).

Los resultados obtenidos del equipo QS5 se analizaron con el *software* “Design and Analysis Software v1.5.1” con el ajuste automático de *baseline* y *threshold*. Se obtuvieron los valores de pendiente, eficiencia, valor de intercepto (y), error y R^2 de cada una de las curvas de calibrado. El procesamiento de datos fue el descrito en 3.2.4.2. Para el cálculo del LOC y LOD, al igual que en la plataforma de Roche, cuando no se observó amplificación, indeterminado o las Cts eran mayores a 40 (QS5), tanto en los NTCs como en las muestras, se asignó para los cálculos $Ct = 40$, ya que valores por encima de 40 implican baja eficiencia en la reacción y generalmente no se reportan (Laamiri *et al.*, 2018)(Wolfinger *et al.*, 2018). El cálculo de el LOC y LOD se calculó tal como se describe en los apartados 3.2.4.3 y 3.2.4.4.

3.2.6. Estudio de IsoformiRs

Se identificó bioinformáticamente si los miARNs de interés tenían isoformas y, en su caso, si se expresaban en el tejido objeto de análisis: el plasma sanguíneo. En primer lugar, para identificar en base a las secuencias de los miARNs de interés si existían isoformas, se utilizó la base de datos miRBase versión 22, actualizada por última vez el 11 de marzo de 2018. Posteriormente, se buscaron cada una de las isoformas en la base de datos miRmine (<https://guanfiles.dcmf.med.umich.edu/mirmine/>) (actualización 2016), la cual ofrece una visión global de los perfiles de expresión de miARNs humanos en distintos tejidos. Esto permitió identificar cuáles de las isoformas tenían una expresión considerable en plasma. Adicionalmente se buscó la existencia de las isoformas en cualquier tipo de fluido en la base de datos miRandola (<http://mirandola.iit.cnr.it/>) (actualización 2017). En ésta se tiene información curada de ARNs no codificantes circulantes.

3.2.7. Evaluación de las cantidades de entrada (*input*) de ARN y cADN

El estudio de ARN *input*, cantidad de entrada de ARN en la RT, se llevó a cabo a partir de ARN de dos procedencias distintas: FirstChoice® Human Brain Total RNA y ARN total obtenido de una mezcla (*pool*) de plasma comercial humano.

El procedimiento para evaluar el efecto de la cantidad de ARN en la RT, con el objetivo de determinar con qué cantidad mínima de ARN se podrían cuantificar los miARNs en las muestras de plasma estudio, consistió en la preparación de una curva estándar formada por 5 puntos: 100, 50, 25, 12.5 y 6.25ng.

Para evaluar el efecto de la dilución del cADN en la qPCR se hizo una curva estándar formada por cADN de la RT procedente de 100ng y diluciones seriadas de este cADN 1:10, 1:50 y 1:100.

Estudio con FirstChoice® Human Brain Total RNA:

- a) A partir de la solución *stock* 1000ng/μL de FirstChoice® Human Brain Total RNA se prepara con agua libre de ARNasas soluciones de trabajo a 20ng/μL y 3ng/μL.
- b) Se aplican las condiciones de RT-qPCR optimizadas ya definidas (tablas 12, 13, 16 y 17 apartado 3.2.3). Solamente se estudian los miARNs miR-191-5p y miR-1306-3p, ya que en el experimento de optimización de la concentración de cebador de RT se observa que estos son los dos únicos miARNs que se expresan en este ARN de cerebro.

En el caso de la mezcla de plasma comercial humano:

- a) se aísla el ARN total (enriquecido en miARNs) de 12 alícuotas de plasma de 200μL con el kit miRNAeasy serum/plasma kit (Qiagen) tal como se describe en el apartado 3.2.1.2.c.
- b) El ARN eluído de cada una de las alícuotas, se une para tener suficiente volumen para realizar el experimento y se cuantifica por espectrofotometría con el equipo NanoDrop One C. Se guarda a -20°C hasta su uso.
- c) A partir de esta solución *stock* de ARN total (22.4 ng/μL) se prepara con agua libre de ARNasas solución de trabajo a 3ng/ μL. Se aplicaron las condiciones de RT-qPCR optimizadas ya definidas (tablas 12, 13, 16 y 17 apartado 3.2.3).

Para cada una de las curvas/miARN se realizaron 3 experimentos independientes, 3 RT-qPCR en las que cada punto se amplificó 3 veces en la qPCR. Para cada punto de la recta se calculó el promedio de Ct de los tres replicados técnicos. Para hacer una representación global de los 3 experimentos independientes se procedió al cálculo del promedio de Ct para cada punto en las 3 rectas. Estos resultados se representaron gráficamente como el Log 10 de la cantidad de ARN *input* y dilución del cADN frente al promedio de Cts.

3.2.8. Evaluación de la sensibilidad y especificidad del método de RT-qPCR optimizado en la plataforma LightCycler480II (Roche) con muestras de plasma de pacientes

Se realizó estudio con 6 muestras de plasma EDTA de pacientes EIA participantes en el estudio. La purificación del ARN total circulante conservando los miARNs se llevó a cabo tal como se describe en el apartado 3.2.1.2.c. Se evaluó la cantidad de ARN *input* de 100ng y la dilución 1:10 del cADN obtenido de la RT de 100ng.

La RT-qPCR se realizó acorde a las condiciones aceptadas como óptimas. Se aplicó el test no paramétrico de Mann-Whitney considerándose diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

3.2.9. Diseño, desarrollo y fabricación del prototipo del kit ScoliPro® basado en la tecnología de RT-qPCR en la plataforma LightCycler 480II (Roche)

Optimizadas las condiciones experimentales de RT-qPCR con los diseños de cebadores y sonda que conforman el prototipo del kit ScoliPro®, se definieron dos controles positivos de RT-qPCR, los cuales, sirvieron para evaluar el funcionamiento kit. El primero de ellos, llamado RTC, consistió en un *pool* formado por 10^8 copias de cada uno los oligos mímicos de los miARNs hsa-miR-122-5p, hsa-miR-223-5p, hsa-miR-1306-3p y hsa-miR-191-5p. El otro control positivo fue el oligo mímico del Cel-miR-39, el cual se evaluó también a 10^8 copias.

3.2.9.1. Estudio con distintos volúmenes y formatos de placa de PCR

Todo el proceso de optimización descrito hasta ahora se realizó utilizando en la RT un volumen de 20µL de reacción y en la etapa de PCR un volumen final de reacción de 10µL en formato de placa de 384 pocillos. Con el objetivo de estudiar si, los resultados obtenidos se podían escalar a otros volúmenes y si eran extrapolables a otros formatos de placa se llevó a cabo el siguiente diseño de experimento:

-RT 20µl (tabla 12 apartado 3.2.3) y:

-PCR en placa de 384 pocillos y volumen de reacción de 10µl (tabla 16 apartado 3.2.3)

→ Condición 1

-PCR en placa de 96 pocillos y volumen de reacción de 10µl (tabla 16 apartado 3.2.3) →

Condición 2

-PCR en placa de 96 pocillos y volumen de reacción de 20µl utilizando como *template* 2µL de cADN (tabla 16 apartado 3.2.3 ajustando los volúmenes a 20µL/reacción) →

Condición 3

-PCR en placa de 96 pocillos y volumen de reacción de 20µl utilizando como *template* 4µL de cADN (tabla 16 apartado 3.2.3 ajustando los volúmenes a 20µL/reacción) →

Condición 4

-RT 10µl (tabla 12 apartado 3.2.3 pero reduciendo los volúmenes a la mitad) y:

-PCR en placa de 384 pocillos y volumen de reacción de 10µl (tabla 16 apartado 3.2.3)

→ Condición 5

-PCR en placa de 96 pocillos y volumen de reacción de 10µl (tabla 16 apartado 3.2.3) →

Condición 6

Para este estudio se utilizaron los controles positivos definidos en el apartado anterior. Se aplicó el test no paramétrico de Kruskal Wallis y posteriormente la prueba post-hoc de Dunn solo en el caso de que el test de Kruskal-Wallis arrojará diferencias estadísticamente significativas. Se compararon todas las condiciones con la condición 1 (condición considerada de referencia, utilizada en el proceso de optimización de la RT-qPCR). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando p valor < 0.05 .

3.2.9.2. Diseño y fabricación del kit ScoliPro®

Una vez comprobada la sensibilidad clínica en muestras de plasma con los componentes de RT-qPCR que conforman el kit y la versatilidad de formato del kit, se estableció el diseño del kit relativo a:

- Volumen, componentes y programa de RT y qPCR
- Control de extracción y controles de RT-qPCR
- Metodología de fabricación del kit de diagnóstico/pronóstico ScoliPro® cumpliendo los requisitos de la norma ISO-13485
- Equipamiento y materiales necesarios para el envasado, etiquetado y conservación
- Instrucciones de uso para usuario

Toda esta información se describe en el PNT de fabricación (F.P.001.E1) y en el manual de instrucciones para usuario del kit ScoliPro® propiedad de EpiDisease.

3.2.10. Redacción de la documentación asociada al ensayo de funcionamiento del kit ScoliPro®

Para estudiar la validez de la función diagnóstico/pronóstico de la firma de miARNs en pacientes con EIA, fue necesaria la colaboración con el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, Hospital Universitario Doctor Peset y con la CRO & SMO Experior S.L. Como se describirá a continuación, los dos hospitales participaron en el reclutamiento de los pacientes a incluir en el ensayo de funcionamiento clínico a pequeña escala, y la compañía Experior coordinó la ejecución del ensayo de funcionamiento del kit.

3.2.10.1. Diseño del ensayo de funcionamiento clínico en colaboración con la Organización de investigación por contrato Experior (CRO, Contract research organization) y redacción de la documentación reglamentaria

Se redactaron los PNT, IT (Instructivos de Trabajo), Registros y documentación del SGC (Sistema de Gestión de la Calidad) relacionados con la evaluación del desempeño del kit, de acuerdo con las normas de buenas prácticas clínicas y la norma ISO 13612. En concreto, se redactaron los PNTs que cubren el proceso de extracción, transporte y procesamiento de las muestras de sangre, así como las hojas de registro de datos de la muestra (hora y condiciones de extracción, procesamiento y almacenamiento, calidad de la muestra).

Junto con el equipo de Experior se definió:

- El Protocolo del ensayo de evaluación de funcionamiento de ScoliPro® como kit IVD titulado “Estudio observacional ambispectivo para la validación clínica a pequeña escala de la función pronóstico del test Scoli-Pro® a partir de pacientes diagnosticados de EIA,

con recogida de datos clínicos desde el momento del diagnóstico” (anexo 1). En él, se describen los objetivos del estudio, criterios de valoración, fuentes de información y ámbito, diseño del estudio, variables e instrumentos de medida, análisis estadístico, aspectos éticos y consideraciones prácticas, así como las responsabilidades del estudio.

- La Hoja de información al paciente (HI), y el Consentimiento Informado (CI) del estudio con un vocabulario acorde a la edad del paciente al que va dirigido, edad entre 10 y 17, así como un protocolo específico para aquellos pacientes que alcanzan la mayoría de edad durante el estudio. También se redacta un HI y CI para padres de pacientes pediátricos (entre 10 años y menores de 12) que asienten y el paciente con su respectivo CI, consiente participar en el estudio (anexos 2-4, respectivamente).

Este proceso significó profundizar en los aspectos técnicos, regulatorios legislativos y éticos (regulación europea sobre Ensayos Clínicos (No 536/2014, ISO 13612, RD 1662/2000, Directiva 98/79/EC, reglamento sobre productos sanitarios IVD IVDR2017/746. Ley 14/2007 de 3 de Julio de Investigación Biomédica, RD 1716/2011 de 18 de noviembre, el REGLAMENTO (UE) 2016/679 sobre protección de las personas físicas en lo que respecta al tratamiento de datos personales y a la libre circulación de estos datos).

3.2.10.2. Cálculo del tamaño muestral

Ya que no se disponía de información previa para realizar un cálculo formal del tamaño de la muestra necesaria para el estudio, puesto que era la primera vez que se evaluaba la capacidad del test ScolioPro® para el diagnóstico/pronóstico de la enfermedad, se decidió junto con la CRO Experior que el tamaño muestral se basara en el número de pacientes disponibles en los dos hospitales participantes en el estudio y que se estimó en 50 pacientes.

3.2.10.3. Solicitud de aprobación del protocolo por el Comité de Ética de Investigación con Medicamentos (CEIm) del Hospital Universitario y Politécnico La Fe y del CEIm del Hospital Universitario Doctor Peset

Como parte del equipo promotor del estudio se colaboró en el proceso de presentación del protocolo indicado anteriormente a los Comités de Ética de sendos Hospitales y en la redacción de la fe de erratas para lograr su aprobación en el Hospital La Fe el día 27 de junio de 2018, y en el caso del Hospital Dr. Peset el día 18 de septiembre de 2018 (anexo 5). La información de los pacientes y los datos clínicos a los que tiene acceso EpiDisease fueron codificados de acuerdo la Ley 14/2007 de 3 de Julio de Investigación Biomédica, RD 1716/2011 de 18 de Noviembre y Ley de Protección de Datos de Carácter Personal LOPD 15/1999 de 13 de diciembre y a la Directiva 95/46/EC del Parlamento y la Comisión Europea de 24 Octubre 1995 sobre la protección de individuos en relación a los datos personales y a la libre circulación de sus datos; y la regulación Europea sobre Ensayos Clínicos (No 536/2014).

3.2.10.4. Colaboración con personal de Hospitales y del Biobanco CIBERER en la toma y procesamiento de las muestras de pacientes

Se realizó un activo intercambio de información, PNTs e ITs con enfermeras, *data manager* y personal del Biobanco para garantizar el cumplimiento del cronograma de reclutamiento, envío de muestras de los Hospitales al Biobanco, entrada y seudonimización de los datos, codificación, recepción, procesamiento y almacenamiento de las muestras acorde a los PNTs antes citados y declarados en el protocolo del estudio. El proceso de extracción de sangre fue llevado a cabo por el personal sanitario especializado mediante venopunción. En ambos hospitales se realizó formación al personal, proporcionando información sobre el estudio y un PNT de extracción de sangre periférica. Este PNT contiene una serie de indicaciones técnicas para evitar la hemólisis de las muestras. Para que tal fin quedase registrado, el personal firmó un documento en el que constaba que había recibido información y formación sobre el ensayo clínico y cómo debía proceder según el PNT aprobado. Tal como se describe en dicho PNT, se extraen 8 ml de sangre periférica por sistema de extracción al vacío Vacutainer® con EDTA-k2 o K3 (2 tubos de 4ml) en cada uno de los 3 tiempos de recogida de la muestra por cada paciente, consistentes en las siguientes tomas: entrada en el estudio (firma del CI), seis meses desde el inicio del estudio y 12 meses desde el inicio del estudio.

Por otro lado, por lo que respecta al procesamiento de sangre y almacenamiento de las muestras de plasma de los pacientes de EIA incluidos en el estudio, fue el Biobanco CIBERER el encargado de esta tarea. En este caso, también se proporcionó el PNT de procesamiento de muestras de plasma y control de calidad de las mismas por espectrofotometría. De forma resumida, los tubos Vacutainer se centrifugan 10 min. a 1.600xg para separar el plasma y posteriormente éste vuelve a centrifugar 15min, a 2.500xg para eliminar los restos celulares. Se coge una pequeña alícuota y se miden los valores de absorbancia a 414nm (determinación de muestras hemolíticas). Se incluyen en el estudio aquellas muestras cuya absorbancia es < 0.2 (Kirschner *et al.*, 2011). El plasma se alícuota en volúmenes de 0.5 mL y se guarda a -80°C . Esta información resumida se detallada en PNTs propiedad de EpiDisease con códigos I.E.T.001.E1 y I.E.T.002.E1.

3.2.10.5. Anotación de los datos clínicos en el CRDe (Cuaderno de Recogida de Datos electrónico) y monitorización de ensayo

La CRO Experior S.L. fue la encargada de coordinar y monitorizar el ensayo de funcionamiento del kit IVD ScoliPro® además de diseñar el CRDe. Se trata de una aplicación/plataforma en la que el personal autorizado de cada uno de los hospitales introdujo las variables clínicas de los pacientes incluidos en el estudio con los datos seudonimizados. La CRO se encargó de alertar al promotor de las desviaciones que conlleva correcciones y notificaciones al CEIm.

3.2.11. Validación del prototipo del kit Scolipro®

3.2.11.1. Descripción de la cohorte estudio para la evaluación de la función diagnóstica del kit Scolipro®

Definida y validada la integración de los componentes del kit, se procedió a la validación de la función diagnóstico del kit con las muestras de plasma EDTA correspondientes a 52 pacientes EIA en el tiempo 0, 1 y 2 (entrada en el estudio, 6 y 12 meses desde el inicio del estudio, respectivamente). Se compararon, de manera independiente, los niveles de expresión de los miARNs de estos pacientes con 20 muestras de controles sanos procedentes del Biobanco IBSP-CV (Investigación Biomédica y Salud Pública de la Comunidad Valenciana). El grupo control estaba formado por muestras de 15 mujeres y 5 hombres (proporción 4:1) de edad entre 10 y 18 años. Los criterios de exclusión fueron: paciente con escoliosis u otra enfermedad, persona fumadora, mujer embarazada y muestra con signos de hemólisis.

En cuanto al grupo de casos, estaba formado por 49 mujeres y 3 hombres de edades comprendidas entre 10 y 18 años.

3.2.11.2. Descripción de la cohorte estudio para la evaluación de la función pronóstica del kit Scolipro®

Para la función pronóstica se estudiaron un total de 40 muestras de plasma EDTA correspondientes a 40 pacientes EIA del tiempo 0, 1 y 2 (entrada en el estudio, 6 y 12 meses desde el inicio del estudio, respectivamente) del Hospital La Fe (Valencia). Teniendo en cuenta que se hizo un seguimiento de 12 meses se consideró como paciente progresivo aquel cuyo ángulo de Cobb varió en el tiempo más de 6° y aquellos pacientes en los que en la entrada en el estudio ya tenían un ángulo de Cobb igual o mayor a 40°.

3.2.11.3. Procesamiento de las muestras de plasma

Esta tarea llevada a cabo por el personal de Biobanco CIBERER se realizó tal como se ha descrito anteriormente en el apartado 3.2.10.4.

3.2.11.4. Purificación de miARNs

La purificación de los miARNs a partir de las muestras de plasma EDTA se realizó tal como se describe en el apartado 3.2.1.2.c En este caso se partió, de cada muestra, de dos alícuotas de 250µL para tener suficiente volumen de ARN para la evaluación de todos los miARNs.

3.2.11.5. Fabricación de kits

Puesto que la evaluación de la función diagnóstico del kit Scolipro® se realizó con un total de 72 muestras de plasma EDTA, y la función pronóstica se llevó a cabo con 40 muestras, se fabricaron dos lotes de kit para la RT-qPCR cada uno acorde al tamaño de muestras a validar.

Este proceso de fabricación consistió en la preparación de varias *pre-mixes*, para lo cual se utilizaron los componentes de los kits *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit* y *LightCycler 480II Probe Master Mix* ambos de Roche, utilizados durante en todo el proceso de optimización de la RT-qPCR. En el caso de la RT, se prepararon dos *pre-mixes*, por un lado, la RTA que contiene los dNTPs, el buffer de RT y el agua y, por otro lado, el componente RTB que contiene la enzima y el inhibidor de ARNasas. Además, para la RT se prepararon 5 viales (RT1-RT5) cada uno de los cuales con el cebador de RT de cada miARN. Por lo que respecta a la qPCR, se alicuotó por un lado la Probe Master Mix y, por otro lado, se prepararon 5 *pre-mixes*, cada una de las cuales contenía el cebador *Forward*, cebador *Reverse* y la sonda de cada uno de los miARNs.

Este proceso se describe en el PNT de fabricación propiedad de EpiDisease (F.P.001.E1).

3.2.11.6. RT-qPCR

Los experimentos de RT-qPCR se realizaron de acorde al manual de instrucciones de uso para usuario kit ScoliPro® (propiedad de EpiDisease). Los programas de RT-qPCR aplicados fueron los definidos en este estudio (ver tabla 12, 13 y 16, 17 para la RT y qPCR apartado 3.2.3, respectivamente).

3.2.11.7. Estadística para la validación función diagnóstica kit ScoliPro®

Para la comparación de los niveles de expresión relativa en las muestras de casos y controles se procedió al cálculo del valor de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ según lo descrito por Livak y colaboradores (Livak and Schmittgen, 2001). En el caso de las muestras de t0 este método se aplicó utilizando el miR-191-5p como miARN de referencia y también utilizando la media geométrica del miR-191-5p y Cel-miR-39, para cada miARN, y para cada réplica:

- 1- $\Delta Ct = Ct_{miARN\ paciente} - Ct_{REF\ paciente}$, (donde Ct REF miR-191-5p o media geométrica miR-191-5p y Cel-miR-39)
- 2- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{miARN\ paciente} - \Delta Ct_{promedio\ miARN\ Controles}$
- 3- $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$

Para el resto de los tiempos (t1 y t2) se aplicó este método, pero utilizando solamente el miR-191-5p como referencia. Antes de realizar el análisis comparativo de los niveles de expresión entre estos dos grupos se aplicó un test de *outliers* (test de Grubbs) de manera que se eliminaron, si era necesario, alguno de los valores previamente a la comparación.

El test estadístico que se aplicó para la comparación de ambos grupos fue el test de Mann-Whitney. Se consideraron las diferencias estadísticamente significativas cuando el p valor fue < 0.05. El rendimiento del modelo diagnóstico se evaluó mediante el análisis de la curva ROC (AUC, sensibilidad y especificidad).

3.2.11.8. Estadística validación función pronóstica kit ScoliPro®

Al igual que en la función diagnóstica se aplicó el test de *outliers* (test de Grubbs) para identificar posibles *outliers*, los cuales no se consideraron para la prueba estadística. En este caso, el método estadístico que se aplicó fue el ΔCt utilizando como miARN de referencia el miR-191-5p ($Ct_{miRinterés} - Ct_{miR-191-5p}$) (Sánchez-De-La-Torre *et al.*, 2015).

El test que se aplicó fue el test de Mann-Whitney, considerándose las diferencias estadísticamente significativas cuando el p valor fue < 0.05 .

4. RESULTADOS

4.1. Evaluación de la sensibilidad de miARNs a la hemólisis

El objetivo del estudio de hemólisis fue determinar si la hemólisis afectaba a la expresión de los miARNs propuestos como biomarcadores y como normalizador endógeno (miR-191-5p). Esto permitió tener unos antecedentes sobre cuán importante es establecer unos protocolos de trabajo rigurosos para el manejo de las muestras y unos puntos de control de la calidad de las mismas.

Los resultados de la búsqueda bibliográfica se resumen en la tabla 28, que también incluye miARNs con una sensibilidad ya estudiada frente a la hemólisis, como es el caso del miR-451a, miARN que es muy sensible a la hemólisis. Y otros, como el miR-23a descrito como un miARN endógeno que no es sensible a la hemólisis y, por tanto, utilizado junto con el miR-451a para el cálculo de un indicador de hemólisis (miR ratio).

Se encontró que el miR-122-5p no se describe en la literatura como un miARN que se afecte por rotura de los eritrocitos, en cambio el miR-191-5p, sí se ha descrito como un miARN ligeramente sensible a la hemólisis. En el caso del miR-1306-3p, miR-27a-5p y miR-223-5p no se encontraron referencias bibliográficas del efecto de la hemólisis sobre sus niveles de expresión en plasma o suero, lo que obligó a evaluarlos experimentalmente.

Tabla 28. Revisión bibliográfica de la sensibilidad de los miARN estudio al efecto de la hemólisis.

miARN biomarcador	Sensible a hemólisis	Bibliografía
miR-451a	Sí	(Kirschner <i>et al.</i> , 2011)(Pritchard <i>et al.</i> , 2012)(Kirschner <i>et al.</i> , 2013)(Shah, Soon and Marsh, 2016)(Cheng <i>et al.</i> , 2013)(Blondal <i>et al.</i> , 2013)(Zhelankin <i>et al.</i> , 2020)
miR-191-5p	Sí, ligeramente	(Myklebust <i>et al.</i> , 2019a) (Mussbacher <i>et al.</i> , 2020)
miR-23a-3p	No/Sí	(Blondal <i>et al.</i> , 2013)(Shah, Soon and Marsh, 2016)(Zhelankin <i>et al.</i> , 2020) (Wu <i>et al.</i> , 2016)// (Mussbacher <i>et al.</i> , 2020)
miR-122-5p	No	(Pritchard <i>et al.</i> , 2012)(McDonald <i>et al.</i> , 2011)(Kirschner <i>et al.</i> , 2013)(MacLellan <i>et al.</i> , 2014)(Meerson and Ploug, 2016)(Panach <i>et al.</i> , 2015)
miR-27a-5p	-	-
miR-223-5p	-	-
miR-1306-3p	-	-

Para ello se realizó un estudio de hemólisis controlada *in vitro* preparando curvas de plasma con distintos grados de hemólisis de acuerdo con el apartado 3.2.1.2.a y se determinaron los valores de absorbancia a 414nm según el apartado 3.2.1.2.b. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 29. Tanto para el sujeto control 1 como para el sujeto control 2, se obtuvieron valores de absorbancia a 414nm por debajo de 0.2 (Kirschner *et al.*, 2011) cuando el % de hemólisis fue igual o menor a 0.063%. Por este motivo, se continuó el estudio de hemólisis con los puntos que comprenden el rango de concentraciones de RBCs más bajo, de 0% a 0.5%, correspondientes a absorbancias de 0,15 a 0,25-0,45, aproximadamente.

Tabla 29. Valores de absorbancia a 414nm para cada una de las muestras estudiadas.

Muestra	% Hemólisis	Absorbancia 414nm
C1.M1	2	1.03
C1.M2	1	0.64
C1.M3	0.5	0.25
C1.M4	0.25	0.23
C1.M5	0.125	0.21
C1.M6	0.063	0.15
C1.M7	0.031	0.15
C1.M8	0.016	0.14
C1.M9	0.008	0.14
C1.M10	0.004	0.06
C1.M11	0	0.15
C2.M1	2	1.69
C2.M2	1	0.70
C2.M3	0.5	0.45
C2.M4	0.25	0.26
C2.M5	0.125	0.21
C2.M6	0.063	0.17
C2.M7	0.031	0.15
C2.M8	0.016	0.15
C2.M9	0.008	0.15
C2.M10	0.004	0.15
C2.M11	0	0.16

C1: individuo control 1; C2: individuo control 2. M1-11: puntos experimentales referidos al % de hemólisis.

Los valores de absorbancia obtenidos a 414nm y resumidos en la tabla 29, se representan en la figura 9. Tanto para el control 1 como 2, se observó un ajuste lineal de la recta, a mayor % de hemólisis, valor de absorbancia a 414 nm más alto. Las ecuaciones de la recta obtenidas en cada uno de los ajustes se representan en dicha figura.

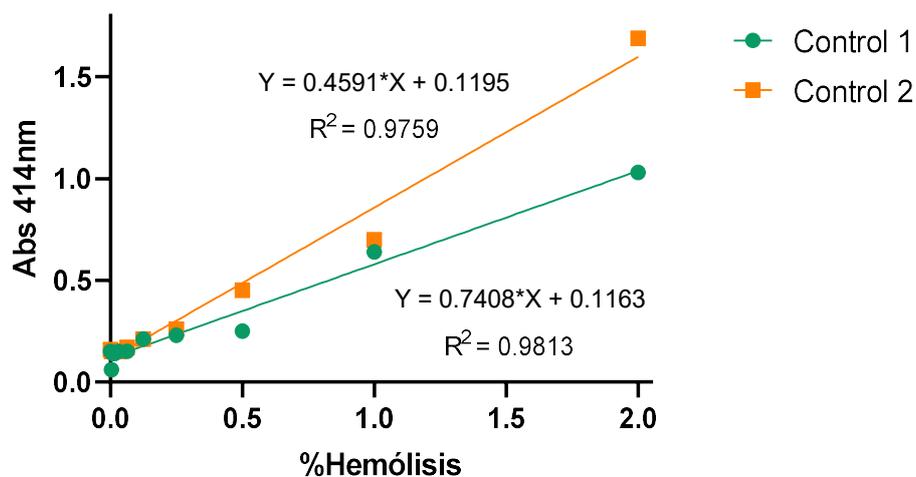


Figura 9. Valores de absorbancia a 414nm en base al % de hemólisis.

Una vez analizados los criterios de hemólisis basados en espectrofotometría, se pasó a calcular aquellos basados en RT-qPCR con los componentes de Thermo Fisher Scientific. En primer lugar, se muestran los valores promedio y SD para cada uno de los miARNs de estudio (tabla 30). Por lo que respecta a los miARN miR-27a-5p (figura 10a), miR-122-5p (figura 10b), miR-1306-3p (figura 10c), no se observó variación alguna en los valores de Ct en los distintos puntos de la curva con diferentes porcentajes de RBCs. Se puede afirmar que estos miARNs no son sensibles a hemólisis. En cambio, en el caso del miR-223-5p, se observó en el sujeto 2, un ligero aumento de los valores de Ct a medida que disminuyó el % de RBCs, manteniéndose constante la expresión en el caso del sujeto 1 (figura 10d). Este miARN en particular, no se puede clasificar, atendiendo a estos resultados, dentro de un grupo u otro. En el otro extremo, el miARN miR-191-5p, la expresión del cual en plasma se vio alterada por la liberación de los eritrocitos, provocando, tal como se observa en los resultados, una disminución de los valores de Ct a medida que aumentó el % de RBCs, indicando por lo tanto que los niveles del miR-191-5p pueden alterarse por el fenómeno de hemólisis (figura 10e).

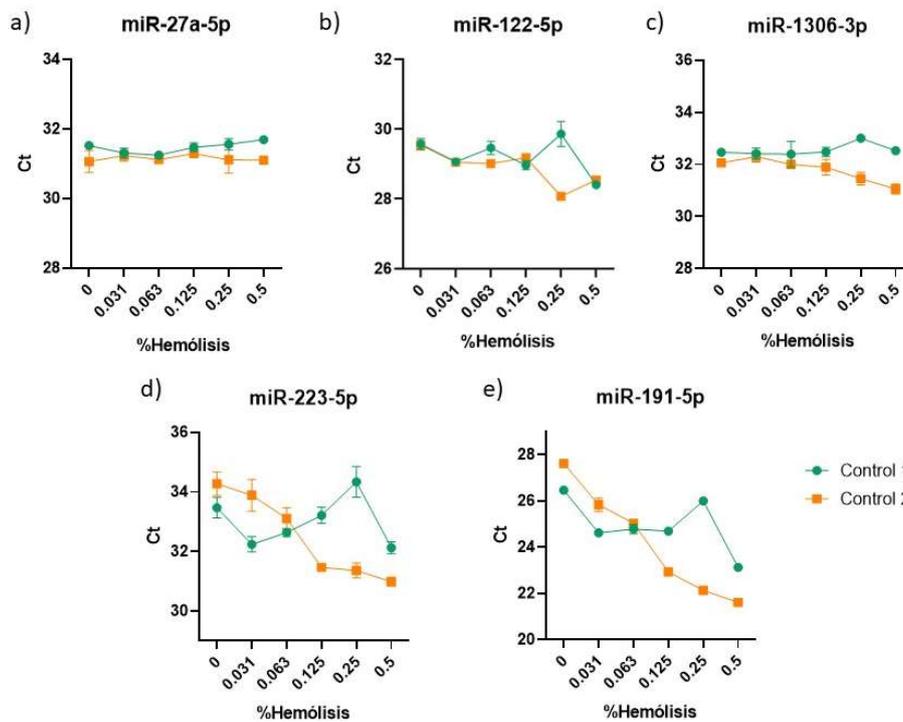


Figura 10. Expresión en muestras de plasma de dos sujetos control con distinto grado de hemólisis de los miARNs a) miR-27a-5p, b) miR-122-5p, c) miR-1306-3p, d) miR-223-5p y e) miR-191-5p.

Tabla 30. Cálculo Cts promedio y SD de los miARNs miR-27a-5p, miR-122-5p, miR-223-5p, miR-1306-3p y miR-191-5p.

% RBCs	Sujeto	Promedio Cts +/- SD miR-27a-5p	Promedio Cts +/- SD miR-122-5p	Promedio Cts +/- SD miR-223-5p	Promedio Cts +/- SD miR-1306-3p	Promedio Cts +/- SD miR-191-5p
0.5	C1.M3	31.69 +/- 0.11	28.40 +/- 0.10	32.13 +/- 0.19	32.53 +/- 0.08	23.12 +/- 0.14
	C2.M3	31.10 +/- 0.09	28.54 +/- 0.05	30.99 +/- 0.15	31.06 +/- 0.20	21.61 +/- 0.06
0.25	C1.M4	31.59 +/- 0.16	29.86 +/- 0.37	34.34 +/- 0.51	33.01 +/- 0.05	26.00 +/- 0.07
	C2.M4	31.25 +/- 0.38	28.07 +/- 0.05	31.36 +/- 0.25	31.46 +/- 0.24	22.13 +/- 0.12
0.125	C1.M5	31.47 +/- 0.13	28.97 +/- 0.13	33.22 +/- 0.27	32.48 +/- 0.17	24.69 +/- 0.05
	C2.M5	31.33 +/- 0.08	29.18 +/- 0.02	31.46 +/- 0.09	31.90 +/- 0.30	22.93 +/- 0.08
0.065	C1.M6	31.24 +/- 0.09	29.46 +/- 0.19	32.64 +/- 0.14	32.12 +/- 0.49	24.78 +/- 0.20
	C2.M6	31.12 +/- 0.09	29.01 +/- 0.04	33.11 +/- 0.36	32.08 +/- 0.14	25.03 +/- 0.04
0.031	C1.M7	31.31 +/- 0.14	29.06 +/- 0.04	32.24 +/- 0.26	32.42 +/- 0.21	24.61 +/- 0.02
	C2.M7	31.24 +/- 0.17	29.05 +/- 0.09	33.89 +/- 0.53	32.30 +/- 0.21	25.83 +/- 0.30
0	C1.M11	31.52 +/- 0.07	29.57 +/- 0.16	33.47 +/- 0.35	32.47 +/- 0.14	26.46 +/- 0.14
	C2.M11	31.06 +/- 0.32	29.54 +/- 0.14	34.28 +/- 0.40	32.06 +/- 0.13	27.62 +/- 0.08

En segundo lugar, con los valores de Ct obtenidos en los miARNs miR-23a-3p y miR-451a, se calculó el indicador de hemólisis de ΔCt ($\Delta Ct = Ct \text{ miR23a} - Ct \text{ miR-451}$) (Blondal *et al.*, 2013) para cada uno de los puntos de la curva en cada uno de los sujetos control (tabla 31). En el cálculo de ΔCt , también llamado miR ratio, el criterio que se utilizó fue 9-11 baja hemólisis; 11-14 hemólisis media; y si el valor de $\Delta Ct > 14$ se consideró una hemólisis alta (Zhelankin *et al.*, 2020). En base a ello, se consideraron como muestras no hemolíticas, con bajo grado de hemólisis, aquellas que tenían un porcentaje de RBCs de 0% y 0.031%. El punto de 0.063% superó ligeramente el rango establecido, por tanto, siendo estrictos, se consideró la muestra con grado medio de hemólisis. Las concentraciones de RBCs restantes, esto es 0.125%, 0.25% y 0.5%, se clasificaron también dentro del grupo de muestras con hemólisis media (tabla 31). Gráficamente, se observó una variación lineal, es decir, a medida que aumentó el % de RBCs el valor de ΔCt fue más alto (Blondal *et al.*, 2013)(Zhelankin *et al.*, 2020)(Shah, Soon and Marsh, 2016), ya que la expresión del miR-23a se mantuvo constante, mientras que aumentó la expresión del miR-451a a medida que aumentó el % de RBCs, haciéndose mayor, por tanto, la diferencia de expresión entre ambos miARNs (figura 11).

Tabla 31. Cálculo de ΔCt para cada uno de los puntos de la curva de hemólisis en cada uno de los sujetos control.

%RBCs	Sujeto	ΔCt Ct miR23a-3p- Ct miR451a	Promedio ΔCt
0.5	C1M3	12.98	13.09
	C2M3	13.41	
0.25	C1M4	12.55	12.75
	C2M4	12.95	
0.125	C1M5	11.88	12.18
	C2M5	12.49	
0.063	C1M6	11.61	11.40
	C2M6	11.18	
0.031	C1M7	10.92	10.86
	C2M7	10.81	
0	C1M11	9.05	9.12
	C2M11	9.20	

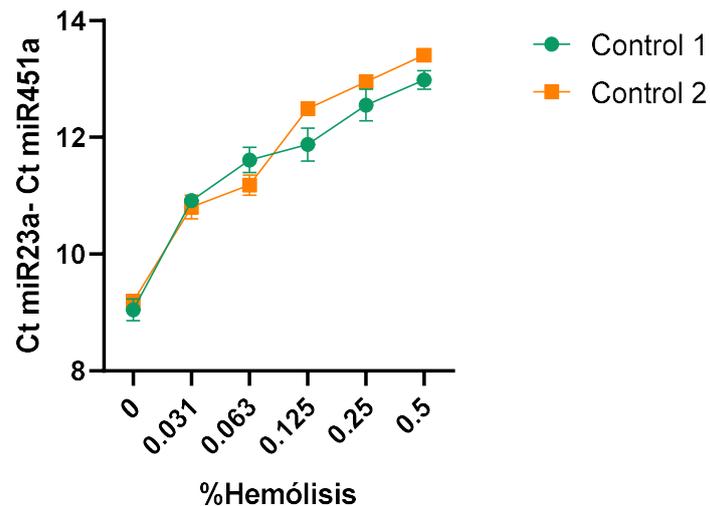


Figura 11. Δ Ct (miR-23a-3p-miR-451a) respecto a los distintos porcentajes de hemólisis en las dos muestras de control estudio.

Con el objetivo de poder correlacionar los valores de absorbancia de la oxihemoglobina y el miR ratio y determinar qué método era más sensible para identificar una muestra hemolítica, se representaron gráficamente los resultados de estas dos variables (figura 12). La línea discontinua separa los Δ Ct que están por debajo de 11, permitiendo clasificar una muestra con bajo riesgo de hemólisis de una muestra con riesgo medio de hemólisis. Se observó cómo tanto en el sujeto control 1 como en el 2, las muestras que se situaron por debajo Δ Ct de 11 pertenecieron a 0% y 0.031% de hemólisis, teniendo un valor de absorbancia menor a 0.2. Los dos puntos que se situaron ligeramente por encima de la línea discontinua, valor ligeramente superior a 11 (ver tabla 31), pertenecieron a las concentraciones de RBCs de 0.063% cuyo valor de absorbancia fue cercano a 0.2, concretamente 0.15 y 0.17 (ver tabla 29), en el control 1 y 2 respectivamente. Para porcentajes más altos de RBCs, en ambos sujetos estudio, el valor de absorbancia a 414nm estuvo por encima de 0.2, superando el valor de Δ Ct a 11. Por tanto, este método de Δ Ct resultó ser más sensible que el valor de absorbancia a 414nm ya que, las muestras con un 0.063% de hemólisis en base al criterio de absorbancia serían consideradas no hemolíticas (absorbancia menor a 0.2), o bajo riesgo de hemólisis, y en base al Δ Ct serían clasificadas como hemolíticas, o grado medio de hemólisis, Δ Ct ligeramente superior a 11. El resto de los puntos de la curva con porcentaje de RBCs superior a 0.063 se considerarían en base a este criterio, como muestras con grado medio hemólisis.

El miR ratio, por tanto, permitió identificar muestras hemolíticas que son incapaces de discriminarse por medición directa de la absorbancia del plasma a 414nm (Shah, Soon and Marsh, 2016).

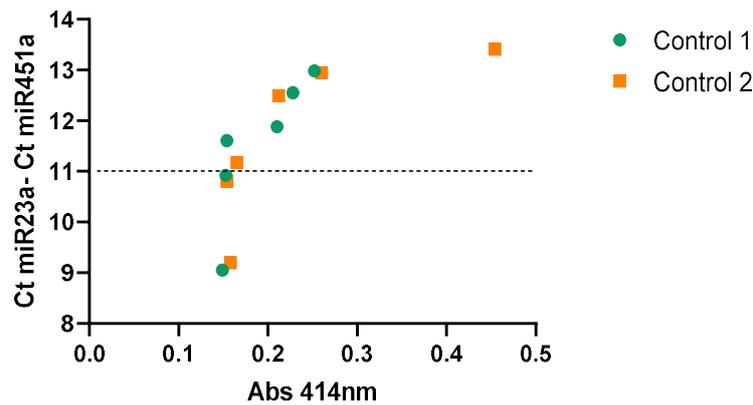


Figura 12. Correlación entre el valor de absorbancia a 414nm y el ΔCt .

Finalmente, el último indicador de hemólisis a estudiar fue la expresión de los miARNs a través del método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Los resultados mostraron que los valores de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ se mantuvieron para todos los miARNs, tal como cabría esperar, alrededor de 1 en el punto de la curva al que no se indujo hemólisis (0% RBCs). En el caso de los miARNs miR-27a-5p (figura 13a), miR-122-5p (figura 13b) y miR-1306-3p (figura 13c), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos porcentajes de hemólisis estudiados. Por tanto, estos miARNs se clasificaron como no sensibles al fenómeno de hemólisis. Dentro de este grupo se incluyó también el miR-223-5p, en el cual el valor de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ se mantuvo constante en todos los puntos de la curva de hemólisis (figura 13d).

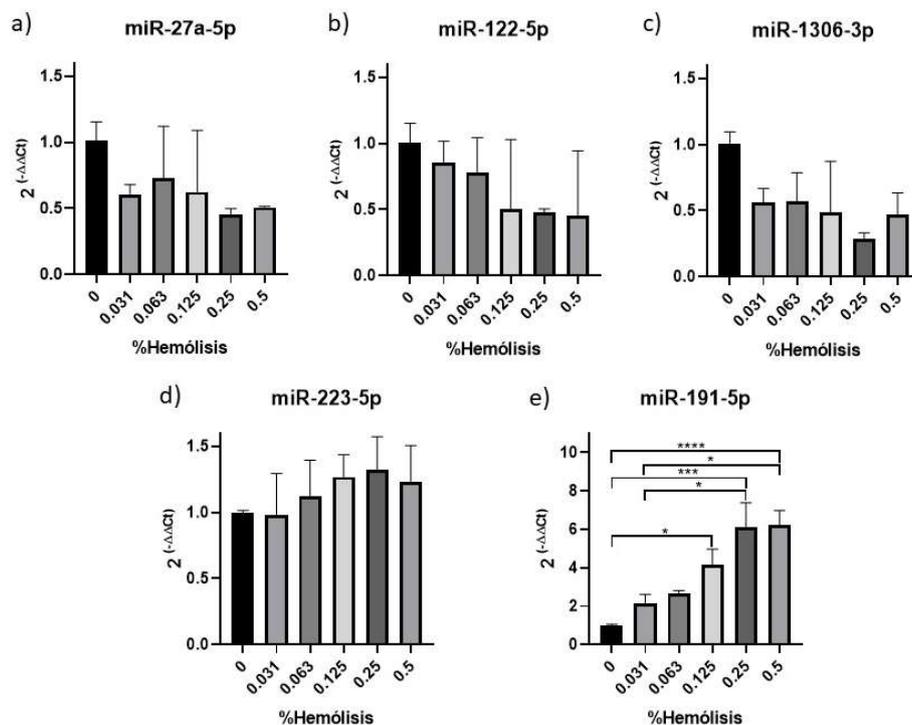


Figura 13. Evaluación de la expresión a través del método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ de los miARNs a) miR-27a-5p, b) miR-122-5p, c) miR-1306-3p, d) miR-223-5p y e) miR-191-5p en muestras con distinto grado de hemólisis. Se aplicó el test de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post-hoc de Dunn. *p valor < 0.05, ***p valor < 0.001, ****p valor < 0.0001.

En cambio, el comportamiento del miARN miR-191-5p fue distinto. Se observó un incremento pronunciado de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ a medida que aumentó el porcentaje de hemólisis. De hecho, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre 0% de hemólisis y 0.125%, 0.25% así como 0.5% de RBCs. La expresión de este miARN aumentó hasta 6 veces cuando se indujo el 0.125% y 0.5% de hemólisis. Del mismo modo, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre 0.031% de hemólisis y los puntos más altos de la curva, esto es, 0.25% y 0.5% (figura 13e).

4.2. Optimización de la RT-qPCR en la plataforma LightCycler 480II (Roche)

4.2.1. Selección de diseños de cebadores

El primer diseño evaluado para el miR-122-5p, miR-27a-5p, así como los dos primeros diseños para el miR-223-5p fueron descartados debido a problemas de sensibilidad de los cebadores aun cuando las curvas de *melting* mostraron un único pico correspondiente a las muestras sin amplificación en el NTC. En cambio, en el caso del miR-1306-3p, el primer diseño fue descartado debido a problemas de especificidad de cebadores al formarse varios productos. Para más detalles ver anexo 6.

Los juegos de cebadores definitivos para cada miARN fueron para el miR-122-5p el diseño número 2, para miR-223 el diseño 3, para el miR-1306 el diseño 2 y para el miR-191 el diseño 1, descritos en el apartado 3.1.2 de Materiales y Métodos. La optimización de los parámetros analíticos de la RT-qPCR, que se describen a continuación, se realizó con estos juegos de cebadores y sonda. Los cebadores y sonda del Cel-miR-39, se evaluaron una vez optimizadas las condiciones para detectar los miARNs en muestras de EIA.

4.2.2. Evaluación de especificidad de cebadores

En el estudio de curvas de *melting* con SYBR Green, se observó para el miR-122-5p, en las dos cantidades evaluadas de 10^7 y 10^5 copias, un único pico bien definido en todos los replicados con Tm entre 78.3°C y 78.5°C. No se apreciaron productos inespecíficos en el NTC. En el estudio electroforético (Qiagxcel) usando tanto la master mix de FirePol, como la Probe master mix (Roche), el producto obtenido para los números de copias antes referidos tenía un tamaño de 69 y de 70-73 pares de bases respectivamente, siendo proporcional la intensidad del pico con la cantidad de *input* de oligo mímico. El tamaño del producto esperado era de 71 pb, similar al obtenido en este estudio. En el NTC por su parte se observaron bandas correspondientes a productos inespecíficos, de tamaños distintos al del amplicón y de muy baja intensidad de fluorescencia. Para más detalles consultar anexo 7.

En cuanto a las curvas de *melting* obtenidas para el miR-223-5p se observó, en las dos cantidades de oligo mímico, un único pico bien definido con una Tm muy similar en estas dos cantidades y en todos sus replicados, que osciló entre 78°C y 78.3°C. Los resultados obtenidos en la electroforesis capilar revelaron un amplicón de 68 y de 70 pares de bases en la condición 1 y 2, respectivamente, siendo el tamaño del producto esperado de 70 pares de bases. Con respecto

al NTC, no hubo amplificación en el experimento con SYBR Green y las bandas en el Qiaxcel fueron tenues y de tamaño distinto al del amplicón. Los resultados se detallan en el anexo 7.

En el caso del miR-1306-3p los resultados de las curvas de *melting* mostraron un pico bien definido para la cantidad de 10^7 copias de oligo mímico del miARN (reproducibilidad en los valores de T_m de los replicados, T_m aprox. 79.9°C). Sin embargo, con 10^5 copias se observó la presencia de dos picos, el de mayor intensidad de fluorescencia con igual T_m que la de 10^7 copias y el otro pico con una T_m menor (entre 76.1°C y 76.4°C). Este comportamiento se observó en todos los replicados de este punto. Además, se produjeron amplificaciones inespecíficas, visibles en el NTC con un pico con una T_m de aproximadamente 76°C , lo que coincidió con el hombro que se observó en la cantidad de 10^5 copias de oligo mímico (anexo 7). Para confirmar estos resultados, se compararon con los obtenidos en la electroforesis capilar utilizando esta misma concentración de cebador de RT. El tamaño esperado del amplicón era de 68 pares de bases. En el caso de la condición 1, el producto amplificado fue de 68 pb (la intensidad del pico fue proporcional a la cantidad de copias). Con 10^5 copias del oligo mímico, se observaron dos bandas, una de 69 pares de bases correspondiente al amplicón, y otra de menor tamaño, aproximadamente de 55 pb, que correspondería con el hombro que se observa en la curva de *melting* para esta cantidad de oligo con una T_m de 76°C . Por lo que respecta a los resultados del NTC, se observó una banda de 55 pares de bases, la cual tenía un tamaño igual a la banda de menor intensidad observada en 10^5 copias. Por tanto, hasta aquí se observó concordancia entre las curvas de *melting* y el análisis por electroforesis capilar. Los resultados obtenidos en la electroforesis capilar en la condición 2, siguieron el mismo comportamiento que en la condición 1, la diferencia radicó en que en 10^5 copias solamente se observó un único pico.

Con estos resultados, se decidió disminuir la concentración del cebador de RT hasta 25nM, con el objetivo de ver si se formaban menos productos inespecíficos en el NTC. El comportamiento de las curvas de *melting* fue igual al observado con 50nM, un único pico correspondiente a la cantidad de 10^7 copias, y en el caso de 10^5 copias, un pico con una T_m aproximada de 79°C y un pico secundario menos pronunciado del que se observaba con 50nM de cebador de RT. De hecho, este producto fue visible en la curva *melting*, pero el programa del equipo no le adjudicó ningún valor de T_m . Este hombro tuvo igual T_m que el NTC, en la condición con 50nM de cebador de RT y 10^5 copias de oligonucleótido. Ahora bien, cuando se analizaron los resultados de Qiaxcel con 25nM de cebador de RT, se observó tanto para la condición 1 como para la 2 en el punto de 10^7 copias una única banda, cuyo tamaño fue en el caso de la condición 1 de 68 pares de bases, y en la condición 2 de 70 pares de bases. Para la cantidad de 10^5 copias de oligo mímico se observaron dos bandas (en ambas condiciones), una de igual tamaño a la de 10^7 copias y otra de menor tamaño e intensidad muy baja, que correspondería con el hombro observado en la *melting* para esta cantidad de oligo y al que se ha hecho referencia anteriormente. Finalmente, en el NTC se observó principalmente una banda de 55 y 56 pb en la condición 1 y 2, respectivamente. Esta banda era de muy baja intensidad cuando se evaluó con FirePol, sin embargo, la intensidad de fluorescencia fue alta cuando se utilizó la Probe Master mix. En el caso de la Fire Pol el tamaño de la banda fue igual a la banda de menor tamaño e intensidad de fluorescencia observada en el ensayo con 10^5 copias. Los detalles se muestran en el anexo 7.

Finalmente, por lo que respecta al miR-191-5p, se observó un único pico correspondiente a las dos cantidades de oligo mímico estudiadas, sin la formación de dímeros de cebadores en el NTC.

La T_m de las curvas de amplificación correspondientes al oligo fue muy similar en todas ellas (T_m entre 78.8°C y 79.1°C). Estos resultados se correlacionaron con los obtenidos en el Qiaxcel, con las dos químicas aplicadas, observándose un pico claramente correspondiente a los oligos mímicos y proporcional a la cantidad de los mismos, sin la presencia de bandas relevantes en los NTCs. El tamaño del producto observado en el caso de la master mix de FirePol fue de 68 pares de bases, mientras que cuando se llevó a cabo el experimento con la Probe Master mix el producto que se observó fue de 71 pb en el caso de 10^7 copias y 70 pb en 10^5 copias de oligo mímico. En ambos casos, el tamaño del amplicón observado se acercó al esperado, el cual tiene una longitud de 72 pares de bases. No obstante, aparecieron picos muy débiles en el gel de electroforesis en los pocillos correspondientes a los NTCs, de tamaño distinto al amplicón diana. Para más detalles consultar el anexo 7.

Por tanto, ante estos resultados, se pudo confirmar que, a excepción del miR-1306-3p, para el resto de miARNs, los cebadores y sondas fueron específicos para el miARN diana para el que habían sido diseñados. Puesto que los resultados descritos para el miR-1306-3p se llevaron a cabo ya con un segundo diseño de cebadores y, además, el método de detección en la qPCR que conformará el Kit Scolipro® es la sonda, no siendo necesario evaluar las curvas de *melting* (De Ronde *et al.*, 2017), se decidió continuar con este diseño de cebadores y ver en el paso de optimización de la concentración de sonda cuál era el comportamiento con esta química.

Para el resto de los experimentos de optimización de la qPCR se continuó en todos los miARNs, con la concentración de cebador de RT de 50nM, determinándose si esta era la concentración óptima o no, más adelante cuando se realizó el experimento de optimización de la concentración de cebador de RT.

4.2.3. Optimización de la qPCR

4.2.3.1. Optimización de la Ta

A continuación, se describen los resultados obtenidos en el proceso de optimización de la Ta para el miR-191-5p, evaluándose las cantidades de 10^7 y 10^5 copias de oligo mímico de este miARN.

La tabla 32 muestra los datos de Ct crudos obtenidos en la RT-qPCR aplicando el gradiente de temperaturas que abarca desde 65°C hasta 52°C, incluyendo Ta de 64.2°C, 62.7°C, 60.3°C, 57°C, 54.6°C y 53°C. Para cada una de las cantidades estudiadas y los controles negativos, NTC y BqPCR, se aplicó un gradiente de colores en función de los valores de Ct, desde el rojo, que indicó los valores de Ct más altos, pasando por el amarillo, hasta el verde que indicó los Cts más bajos.

Los valores de Ct más altos se obtuvieron cuando se utilizó la Ta de 65°C. De hecho, cuando se aplicó esta Ta y la Ta de 64.2°C los valores de Ct del punto 10^5 copias fueron cercanos a 40. Por el contrario, los valores más bajos de Ct, para las dos cantidades estudiadas, se obtuvieron a temperaturas menores, esto es, 57°C, 54.6°C y 53°C. El gradiente de temperaturas aplicado va en sintonía con la variación en los valores de Ct. A mayor temperatura, condiciones de PCR más

restrictivas, mayor valor de Ct (rojo). A medida que la temperatura disminuyó, las condiciones eran más laxas, y los Cts disminuyeron (verde). Aunque, como se puede observar en la tabla 32, cuando se aplicó la Ta de 52°C, los valores de Ct en 10⁷ copias de oligo del miARN, fueron más altos que aquellos obtenidos a temperaturas mayores (57°C, 54.6°C y 53°C), marcados en amarillo, en el caso de 10⁵ copias los valores de Ct fueron similares a los obtenidos en las temperaturas de 57°C, 54.6 °C y 53°C.

Tabla 32. Datos crudos de Ct obtenidos en el proceso de optimización de la Ta en el que se aplicó un gradiente de temperaturas desde 65°C hasta 52°C. En rojo: valores de Ct altos. Verde: valores de Ct bajos. Amarillo: Cts intermedios. RT1: replicado 1 de RT; RT2: replicado 2 de RT

Muestras/ Tª annealing (°C)	65	64,2	62,7	60,3	57	54,6	53	52
10 ⁷ copias oligo mímico RT1	33,33	32,35	30,86	28,54	28,50	28,62	28,50	31,91
10 ⁷ copias oligo mímico RT1	32,05	32,21	29,74	29,88	27,79	27,92	28,43	29,27
10 ⁷ copias oligo mímico RT2	33,71	32,30	30,75	29,16	28,73	28,98	28,85	29,54
10 ⁷ copias oligo mímico RT2	32,93	32,50	30,35	29,41	28,52	28,66	28,66	30,07
10 ⁵ copias oligo mímico RT1	42,19	36,90	35,89	35,52	34,49	34,27	34,28	35,93
10 ⁵ copias oligo mímico RT1	36,75	39,53	35,22	34,60	33,72	35,72	34,65	33,59
10 ⁵ copias oligo mímico RT2	Indeterminado	37,71	36,75	35,46	35,24	35,68	37,94	35,04
10 ⁵ copias oligo mímico RT2	38,93	37,60	35,38	35,21	34,53	35,27	34,57	37,79
NTC RT1	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	41,07	36,76	39,42	41,72
NTC RT2	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	41,82	Indeterminado	40,02	36,88
BqPCR	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	40,77	38,23	42,61
BqPCR	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado	42,47	Indeterminado	41,89

Respecto a los NTCs, no se observó amplificación cuando se aplicaron unas Ta de 65°C, 64.2°C, 62.7°C y 60.3°C. Para el resto de las temperaturas, se observaron algunas amplificaciones inespecíficas a Cts altos. En la tabla 32 se muestra cómo, los Cts obtenidos con estas Ta estuvieron, en la mayoría de los casos por encima de 40. A diferencia de otros termocicladores, el equipo iQ5 de BIORAD utilizado en este experimento sí que llegó a detectar Cts mayores.

La reproducibilidad de los replicados para cada uno de los puntos/Ta se calculó a través de la SD de los valores de Ct. Para ello, se utilizaron los datos crudos de la tabla 32. La tabla 33 muestra los valores promedio y la desviación estándar de cada uno de los puntos, para cada una de las Ta estudiadas.

Se observó una disminución, al igual que como se ha comentado con los datos crudos, de los valores de Ct promedio a medida que disminuyó la variable estudio. Esto fue más pronunciado cuando se evaluaron 10⁷ copias del oligo, a excepción de la Ta de 52°C en la que se produjo un repunte en los valores de Ct. También se observó esta disminución en 10⁵ copias entre las Ta de 65°C hasta 57°C. En este caso, los valores promedio se estabilizaron cuando la Ta estuvo por debajo de 57°C. Para una Ta dada, en general, la SD es menor, en 10⁷ copias ya que con la cantidad de 10⁵ copias los valores de Ct se acercaron más a 40 ciclos.

Tabla 33. Resumen Ct promedio (Ct_p) y desviación estándar calculadas para 10⁷ y 10⁵ copias de oligo mímico del miR-191-5p aplicando 8 Ta distintas.

	Ta (°C)	65	64,2	62,7	60,3	57	54,6	53	52
10 ⁷ copias	Ct _p +/-	33,01	32,34	30,43	29,25	28,38	28,55	28,61	30,19
	SD	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
		0,71	0,12	0,51	0,56	0,41	0,45	0,19	1,19
10 ⁵ copias	Ct _p +/-	39,29	37,94	35,81	35,20	34,50	35,23	35,36	35,59
	SD	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
		2,74	1,12	0,69	0,42	0,62	0,68	1,73	1,76

Una vez evaluados los resultados de sensibilidad, se describen las curvas de *melting*. La figura 14 muestra las curvas de *melting* obtenidas en la amplificación del punto 10^7 copias de oligo mímico. De todas las curvas de amplificación, la que presentó mayor intensidad de fluorescencia fue en la que se aplicó la T_a de 65°C , seguida de la curva obtenida con 57°C y de 62°C . En cambio, se observó la intensidad de fluorescencia más baja cuando se aplicó la T_a de 52°C . En la figura 15, en la cual se representan las curvas de *melting* obtenidas al amplificar 10^5 copias de oligo mímico del miARN, los picos más altos de fluorescencia correspondieron al producto amplificado cuando se aplicó las T_a de 60°C y 57°C . Las intensidades de fluorescencia más bajas se obtuvieron con T_a de 65°C y 52°C . El hecho de que para cada una de las cantidades de oligo mímico, se obtuviese mayor intensidad de fluorescencia con T_a distintas, estuvo en concordancia con los valores de C_t obtenidos resumidos en la tabla 32, ya que en la cantidad de 10^5 copias cuando se aplicaron las T_a de 65°C y 62°C , los valores de C_t fueron muy altos (T_a muy estrictas que no permitieron la amplificación del *target*), esto hace que las intensidad de fluorescencia de las curvas de *melting* correspondientes no fuesen tan altas y que, con T_a más bajas, como es el caso de 60°C y 57°C se obtuviesen intensidades de fluorescencia mayores. Es por ello, que los resultados obtenidos con la cantidad de oligo de 10^7 copias (tabla 33) fueron más representativos.

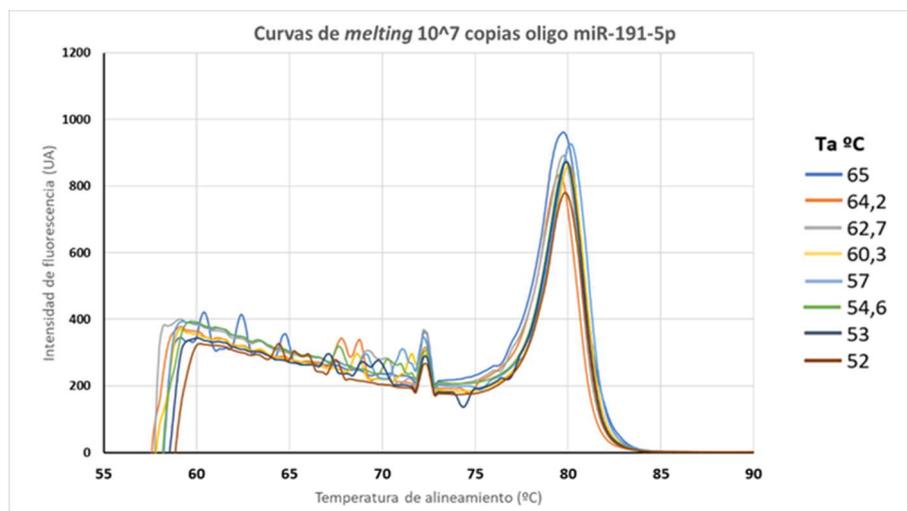


Figura 14. Curvas de *melting* correspondientes a la amplificación de 10^7 copias de oligo mímico del miARN miR-191-5p aplicando en la PCR un gradiente T_a (65°C - 52°C).

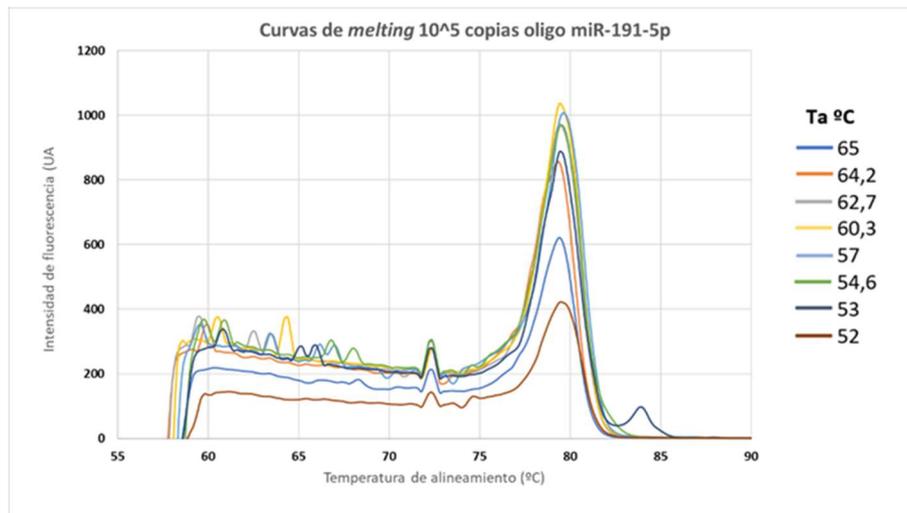


Figura 15. Curvas de *melting* correspondientes a la amplificación de 10^5 copias de oligo mimico del miARN miR-191-5p aplicando en la PCR un gradiente T_a (65°C - 52°C).

Por otro lado, las curvas de *melting* de los NTCs y BqPCR, se muestran en las figuras 16 y 17, respectivamente. En el caso de los NTCs, se puede observar cómo se formaron más productos inespecíficos, con intensidad de fluorescencia alrededor de 350-400 Unidades arbitrarias (UA) de fluorescencia, cuando se utilizaron T_a más laxas, esto es 57°C , $54,6^\circ\text{C}$, 53°C y 52°C . Estos resultados van en concordancia con los datos de Ct obtenidos (tabla 32) ya que a estas T_a se observó amplificación, con Cts cercanas o superiores a 40. Sin embargo, cuando se aplicaron T_a más altas no se observaron inespecificidades en las curvas de *melting* de los NTCs, en las que el termociclador reportó el resultado como indeterminado.

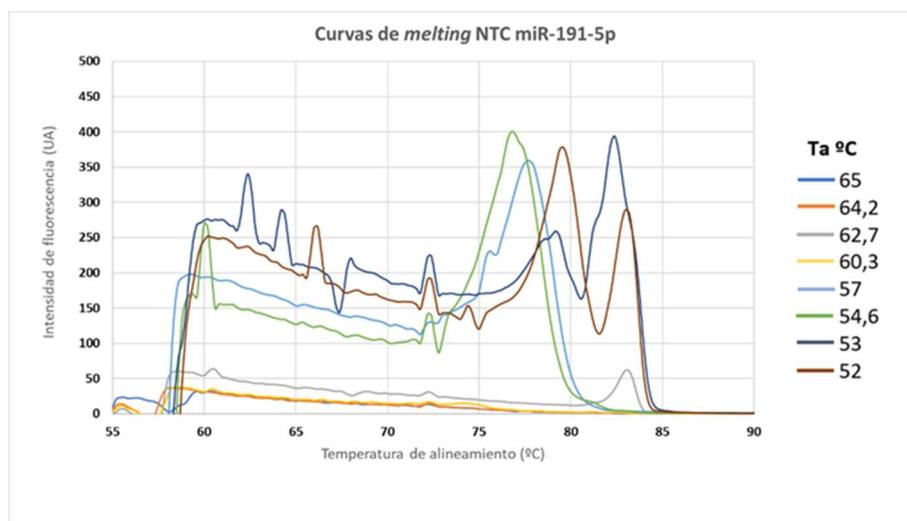


Figura 16. Curvas de *melting* correspondientes a los NTCs obtenidos en el proceso de optimización de la T_a de la qPCR del miR-191-5p.

El comportamiento de los NTCs fue similar al que se observó con los BqPCR (figura 17). Solamente se observaron algunas inespecificidades cuando se utilizó la Ta de 54.6°C, 53°C y 52°C, con intensidades de fluorescencia menores que para el caso de los NTCs. Estas amplificaciones inespecíficas, corresponden también a Cts muy cercanas o superiores a 40, sin relevancia alguna.

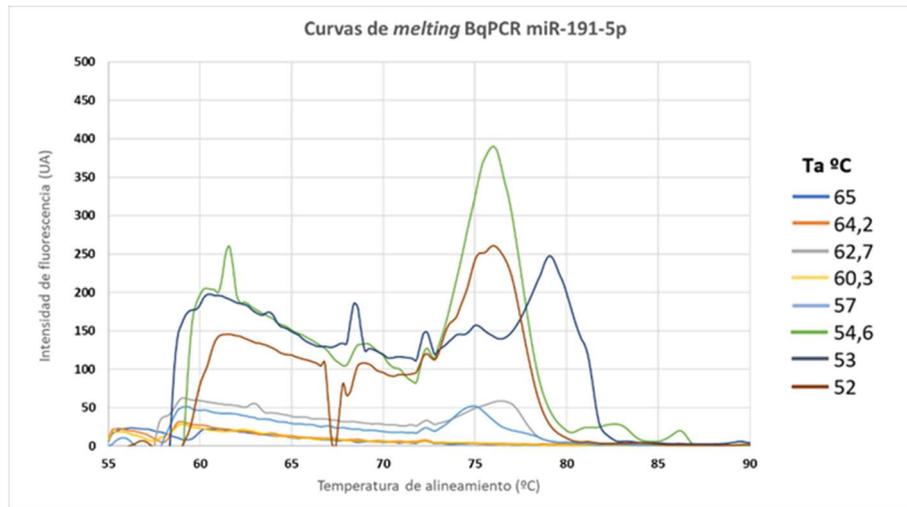


Figura 17. Curvas de *melting* correspondientes al BqPCR obtenidas en el proceso de optimización de la Ta de la qPCR del miR-191-5p.

Finalmente, para determinar la Ta óptima, hay que tener en cuenta el rendimiento de la reacción. Las figuras 18 y 19, muestran las curvas de amplificación obtenidas con 10^7 y 10^5 copias de oligo mimico, respectivamente. En ambas, se obtuvo un mayor rendimiento con las Ta de 54°C, 57°C y 53°C, seguidas de 60.3 °C y 52°C, en el caso de 10^7 copias y de 60.3 °C y 62.7°C en el caso de 10^5 copias de oligo del miARN. Por el contrario, el rendimiento fue menor cuando se aplicaron las Ta de 65°C y 64.2°C.

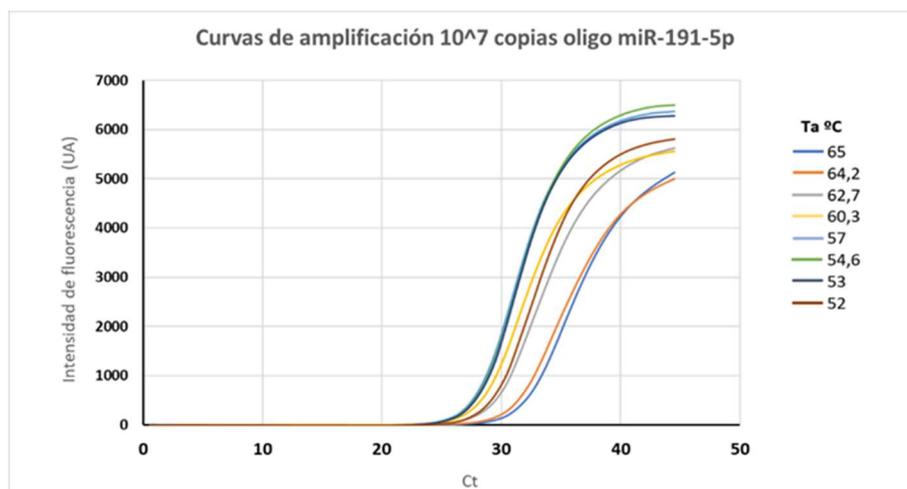


Figura 18. Curvas de amplificación obtenidas con SYBR Green correspondientes 10^7 copias del miR-191-5p aplicando un gradiente de temperaturas.

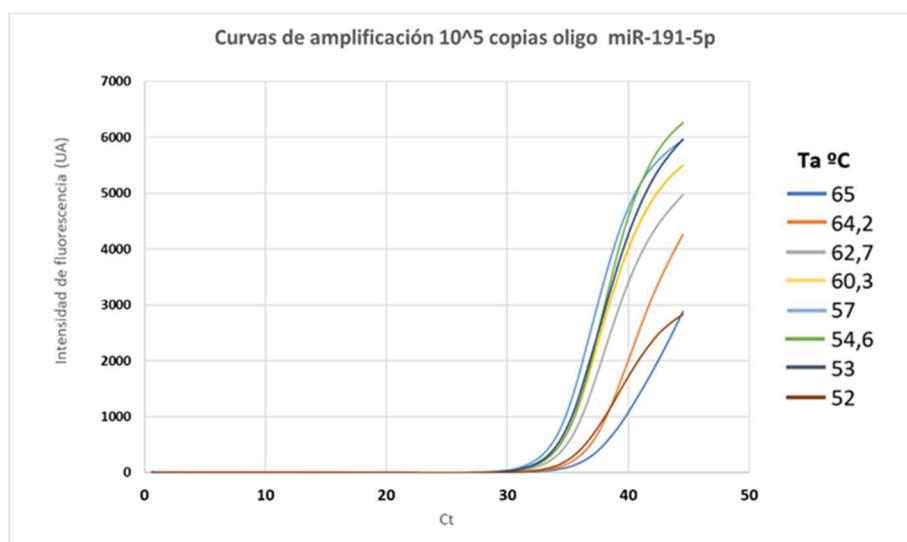


Figura 19. Curvas de amplificación obtenidas con SYBR Green correspondientes 10^5 copias del miR-191-5p aplicando un gradiente de temperaturas.

Después de este análisis, se estableció que la temperatura óptima era de 60°C . La sensibilidad, determinada por los valores de Ct fue similar a la obtenida con las Ta 57°C , $54,6^{\circ}\text{C}$, 53°C y 52°C , sin que se formasen los productos inespecíficos en el NTC y BqPCR que se detectaban en estas últimas (figura 16 y 17). Con Ta superiores a 60°C , la sensibilidad disminuyó. Además, con la Ta de 60°C se observó la formación de un único pico en las muestras e intensidad de fluorescencia alta (figura 14 y 15). En cuanto a la reproducibilidad de los replicados, para las dos cantidades estudiadas, se obtuvo una SD menor a 0.6. Finalmente, con respecto al rendimiento de la reacción, como lo muestra la intensidad de fluorescencia de la curva de amplificación (figura 18 y 19), solamente tenían mayor rendimiento las curvas en las que se aplicó Ta más bajas, en las cuales como ya se ha comentado se formaron dímeros de cebadores.

4.2.3.2. Optimización de la concentración de cebadores F y R

A continuación, se describen los resultados que se obtuvieron al amplificar 10^7 y 10^5 copias de oligo mímico con 9 combinaciones de concentraciones de $0,25\mu\text{M}$, $0,5\mu\text{M}$ y $1\mu\text{M}$ para cada uno de los cebadores. La tabla 34 muestra la asociación de cada una de estas nueve combinaciones con el nombre de condición asignada, de ahora adelante, condición 1-9.

Tabla 34. Combinaciones de concentraciones de F y R evaluadas y el nombre asignado, condición 1-9, a cada una de ellas.

Reverse (μM)	Forward (μM)		
	0.25	0.5	1
0.25	Condición 1	Condición 4	Condición 7
0.5	Condición 2	Condición 5	Condición 8
1	Condición 3	Condición 6	Condición 9

Las curvas y los picos de *melting*, así como las tablas asociadas que contienen la T_m , área, anchura y altura del pico correspondiente al producto formado, se recopilan en los anexos 8-11.

En este apartado se recogen también, los valores de Ct de los puntos estudiados con oligo mímico de cada uno de los miARNs. No se muestran los valores en Ct de los NTCs. En todos los casos, a excepción del miR-1306-3p (valores de Ct del NTC=35), los valores de Ct obtenidos para el NTC fueron de 40 o indeterminados.

La figura 20a muestra los valores de Ct promedio obtenidos con el miR-122-5p cuando se evaluó la cantidad de 10^7 copias de oligo mímico de este miARN. Se puede observar cómo los valores de Ct promedio disminuyeron de manera lineal desde la combinación 1-9 (tabla 35). El valor de Ct más alto, 26.1 (aprox.), se obtuvo con 0.25 μ M de F y 0.25 μ M de R (condición 1), mientras que el valor más bajo de Ct, 23.5, se obtuvo cuando se combinaron concentraciones equimolares de 1 μ M de F y R. En la figura 20a se muestra entre qué combinaciones de cebadores se observaron diferencias estadísticamente significativas al evaluarse el valor de Ct.

Sin embargo, en la cantidad de 10^5 copias (figura 20b), aunque la sensibilidad más alta se obtuvo con la condición 9, Cts de 32.4 ciclos, y los valores de Ct más altos se obtuvieron con las condiciones 1 y 3, la variación de Cts entre todas las combinaciones estudiadas no fue lineal (ver figura 20b y tabla 35). En esta figura se señala entre qué grupo de combinaciones de cebadores se observaron diferencias estadísticamente significativas. En la tabla 35 se resumen los valores de Ct promedio y la SD de los replicados de cada uno de los dos puntos evaluados para el miR-122-5p.

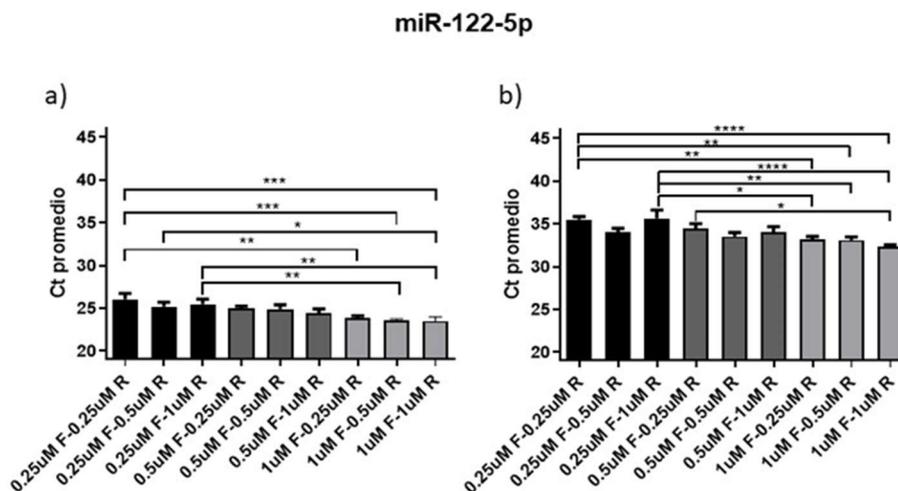


Figura 20. Resultados obtenidos en la optimización de concentración de cebadores *Forward* y *Reverse* del miR-122-5p utilizando la cantidad de a) 10^7 y b) 10^5 copias de oligo mímico de este miARN. En el cálculo estadístico se aplicó el test de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post-hoc de Dunn. *p valor < 0.05, **p valor < 0.01, ***p valor < 0.001, ****p valor < 0.0001.

Tabla 35. Valores Ct promedio y desviación estándar obtenidos para las cantidades de 10^7 y 10^5 copias de oligo mímico del miR-122-5p con las nueve combinaciones de cebadores estudiadas.

	Cond.1	Cond.2	Cond.3	Cond.4	Cond.5	Cond.6	Cond.7	Cond.8	Cond.9
Ct_p 10⁷ copias +/- SD	26,06 +/- 0,66	25,20 +/- 0,52	25,50 +/- 0,55	24,95 +/- 0,29	24,90 +/- 0,49	24,46 +/- 0,45	23,89 +/- 0,24	23,53 +/- 0,22	23,51 +/- 0,49
Ct_p 10⁵ copias +/- SD	35,52 +/- 0,34	34,05 +/- 0,44	35,63 +/- 1,00	34,42 +/- 0,62	33,55 +/- 0,44	34,03 +/- 0,64	33,20 +/- 0,33	33,11 +/- 0,37	32,38 +/- 0,18

Atendiendo a los resultados obtenidos en las curvas de *melting* (ver anexo 8), se observó en las condiciones 1-5 un único pico, correspondiente al producto, sin la formación de dímeros de cebadores. Sin embargo, sí que se observaron estos productos inespecíficos en NTC en la condición 6 (0.5 μ M F -1 μ M R) y en las condiciones 7-9 en las que la concentración de *Forward* era más alta, 1 μ M.

Para el miR-122-5p se definió como concentración óptima de cebadores *Forward* y *Reverse*, la concentración equimolar de 0.5 μ M (Condición 5), ya que atendiendo a los valores de Ct promedio las diferencias no fueron significativas cuando se compararon con las condiciones 6-9 en las que los valores de Ct fueron ligeramente más bajos, condiciones en las que, además, como se ha señalado, se formaron dímeros de cebadores en el NTC. En el caso de la condición 5, se observó un único pico definido en las curvas de *melting* correspondiente al oligo, sin amplificaciones inespecíficas en estos NTCs. Además, en la condición 5 la desviación estándar de los replicados fue menor a 0.5.

Por lo que respecta al miR-223-5p los resultados obtenidos se representan en la figura 21, para 10^7 copias y 10^5 copias de oligo mímico, apartado a y b respectivamente. En ambas cantidades los valores de Cts más altos se observaron en las condiciones 1-3. En el caso de 10^7 copias de oligo mímico los valores de Ct más bajos se obtuvieron en las condiciones 5-9, mientras que en 10^5 se obtuvo mayor sensibilidad en las condiciones 4-9 (ver tabla 36). Aunque el comportamiento en las dos cantidades fue similar, en el caso de 10^7 copias de oligo mímico no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos (figura 21a). Sin embargo, en la cantidad de 10^5 copias se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones 1 (0.25 μ M F- 0.25 μ M R) y 4 (0.5 μ M F- 0.25 μ M R), 1 (0.25 μ M F- 0.25 μ M R) y 6 (0.5 μ M F- 1 μ M R) y finalmente entre 2 (0.25 μ M F- 0.5 μ M R) y 6 (0.5 μ M F- 1 μ M R) (figura 21b).

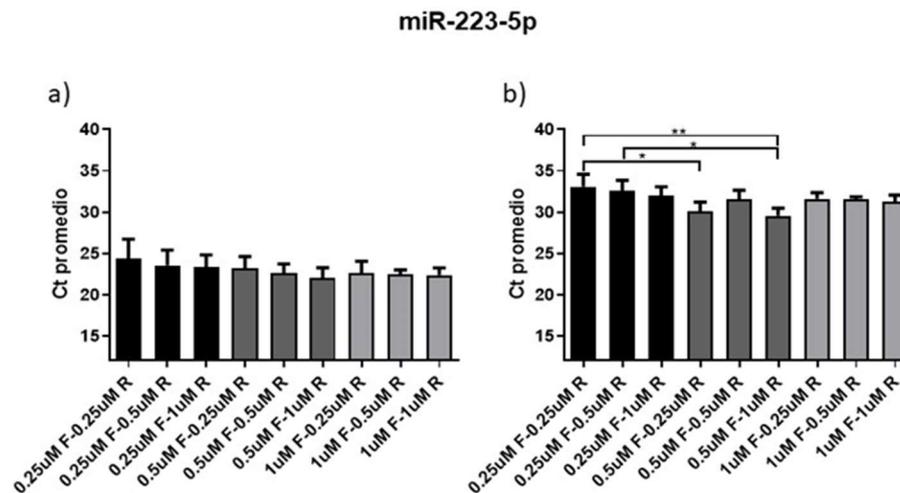


Figura 21. Resultados obtenidos en la optimización de concentración de cebadores *Forward* y *Reverse* del miR-223-5p utilizando la cantidad de a) 10^7 y b) 10^5 copias de oligo mímico de este miARN. En el cálculo estadístico se aplicó el test de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post-hoc de Dunn. *p valor < 0.05, **p valor < 0.01.

Para el miR-223-5p se observó de manera general, en todas las combinaciones de cebadores, una menor reproducibilidad de los replicados que en el caso del miR-122-5p, con una mayor desviación estándar (tabla 36). Se observa que esta variabilidad fue mayor, en todas las condiciones, cuando se evaluó la cantidad de 10^7 copias de oligo mímico. Además, se observó una tendencia al aumento de la SD desde la condición 9 a 1.

Tabla 36. Resumen Ct promedio y desviación estándar los replicados de cada una de las 9 combinaciones de concentraciones de cebadores F y R evaluadas con 10^7 y 10^5 copias de oligo mímico del miR-223-5p.

	Cond.1	Cond.2	Cond.3	Cond.4	Cond.5	Cond.6	Cond.7	Cond.8	Cond.9
Ct_p 10⁷ copias +/- SD	24,38 +/- 2,32	23,54 +/- 1,86	23,35 +/- 1,46	23,21 +/- 1,40	22,63 +/- 1,11	22,01 +/- 1,26	22,66 +/- 1,38	22,49 +/- 0,52	22,37 +/- 0,86
Ct_p 10⁵ copias +/- SD	33,08 +/- 1,50	32,56 +/- 1,29	32,03 +/- 1,03	30,10 +/- 1,12	31,60 +/- 1,04	29,57 +/- 0,90	31,61 +/- 0,71	31,56 +/- 0,29	31,28 +/- 0,76

Atendiendo a las curvas de *melting*, en las condiciones 1-6 se observó un único pico correspondiente al oligo mímico, sin la formación de productos inespecíficos. Sin embargo, en las condiciones 7-9 se empezaron a observar dímeros de cebadores en los NTCs de tamaño similar al amplicón. Por tanto, este resultado indicó que, al aumentar la concentración de *Forward* a $1\mu\text{M}$ se favorecía la formación de productos inespecíficos, debido a que hay un exceso de este cebador. Para más detalles ver anexo 9.

Según los resultados obtenidos y descritos anteriormente, las condiciones 4, 5 y 6, cumplen los requisitos necesarios para dar por optimizada la concentración de cebadores F y R. En este caso, se eligió la combinación $0.5\mu\text{M}$ F y $0.5\mu\text{M}$ R ya que la bibliografía recomienda utilizar concentraciones equimolares y así, poder homogenizar las condiciones de RT-qPCR para todos los miARNs estudiados.

Por lo que respecta al miR-1306-3p, la figura 22a resume los resultados obtenidos con 10^7 copias de oligo mímico de este miARN, mientras que la figura 22b muestra los resultados obtenidos para 10^5 copias. En ambos casos, la sensibilidad fue mayor en las condiciones 6 y 9. En cambio, los resultados con menor sensibilidad se obtuvieron en la condición 1, en la que se utilizaron concentraciones equimolares de F y R de $0.25\mu\text{M}$, así como en la condición 4, en la que también se utilizó $0.25\mu\text{M}$ de R combinado con $0.5\mu\text{M}$ F. En el caso de 10^7 copias, también se observaron valores de Ct altos en la condición 7 ($1\mu\text{M}$ F- $0.25\mu\text{M}$ R) (ver tabla 37). Para ambas cantidades estudiadas cuando se fijó la concentración de F, los valores de Ct disminuyeron a medida que aumentó la concentración de R. En cambio, cuando se mantuvo constante la concentración de R y se aumentó la concentración de F no se observó una disminución/variación de los valores de Ct. Por tanto, en este miARN la concentración de R tiene un efecto directo en la sensibilidad. En la figura 22 se indican las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados.

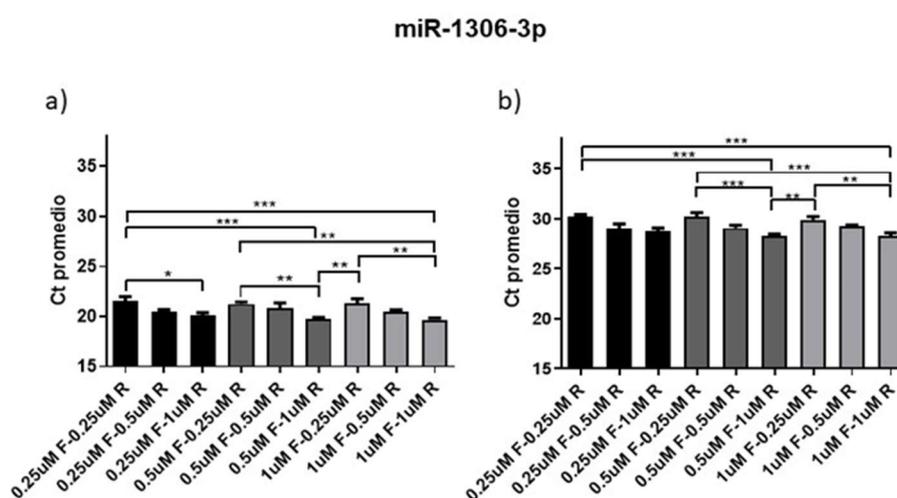


Figura 22. Resultados obtenidos en la optimización de concentración de cebadores *Forward* y *Reverse* del miR-1306-3p utilizando la cantidad de a) 10^7 y b) 10^5 copias de oligo mímico de este miARN. En el cálculo estadístico se aplicó el test de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post-hoc de Dunn. *p valor < 0.05, **p valor < 0.01, ***p valor < 0.001.

En todas las condiciones experimentales, la variabilidad entre los replicados fue baja, la desviación estándar fue menor a 0.5. Es en este miARN en el que se observó mayor reproducibilidad en los replicados.

Tabla 37. Cts promedios y desviaciones estándar obtenidas con nueve combinaciones de concentraciones de F y R con las cantidades de oligo mímico de 10^7 y 10^5 copias del miR-1306-3p.

	Cond.1	Cond.2	Cond.3	Cond.4	Cond.5	Cond.6	Cond.7	Cond.8	Cond.9
Ct_p 10⁷ copias +/- SD	21,54 +/- 0,44	20,50 +/- 0,19	20,10 +/- 0,26	21,26 +/- 0,18	20,81 +/- 0,53	19,76 +/- 0,16	21,33 +/- 0,44	20,50 +/- 0,14	19,68 +/- 0,17
Ct_p 10⁵ copias +/- SD	30,17 +/- 0,25	29,01 +/- 0,47	28,79 +/- 0,27	30,23 +/- 0,38	29,07 +/- 0,27	28,33 +/- 0,14	29,90 +/- 0,32	29,23 +/- 0,17	28,30 +/- 0,30

A diferencia de lo que ocurrió con el resto de miARNs, los valores de Ct de los NTC fueron en todos los casos de 35. Esto estuvo de acuerdo con los resultados que se describen a continuación obtenidos en las curvas de *melting*. Así pues, en las curvas de *melting* para el miR-1306-3p recopiladas en el anexo 10, se observaron productos inespecíficos en el NTC en todas las combinaciones de concentraciones de cebadores estudiadas. La T_m de estos productos inespecíficos, fue de 73-76°C, en las condiciones 0.25 μM F-0.25 μM R (condición 1) y 0.25 μM F-0.5 μM R (condición 2). Las intensidades de fluorescencia de estos dímeros fueron más bajas que las obtenidas para el producto específico. En el resto de las condiciones (condición 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9), el producto inespecífico observado en el NTC tuvo un pico bien definido con una T_m de 76°C. Este pico, se diferenció claramente del correspondiente al del oligo mímico, que tuvo una T_m de 79°C aproximadamente. En la combinación de 0.5μM F-0.25 μM R (condición 4), ocurrió como en las condiciones 1 y 2 antes comentadas, de manera que el pico correspondiente al producto específico presentó una mayor intensidad de fluorescencia que los dímeros de cebadores formados en el NTC. Para el resto de las condiciones (condición 3 y 5-9), los dímeros de cebadores observados en el NTC tuvieron una intensidad de fluorescencia igual o cercana a la del producto, miR-1306-3p. Con concentraciones de cebadores más altas, como son estos casos, se favoreció la formación de productos inespecíficos.

Finalmente, respecto al miR-191-5p, la figura 23 resume los resultados obtenidos con 10⁷ y 10⁵ copias de oligo mímico de este miARN, apartado a y b respectivamente. En ambas cantidades los valores de Ct más bajos se obtuvieron en las condiciones 7-9, siendo los mejores resultados en cuanto a la sensibilidad, los resultados obtenidos con la combinación de 1μM de *Forward* y 0.5μM de *Reverse* (Condición 8). En cambio, los valores de Ct más altos, se observaron en las dos cantidades estudiadas, en las condiciones 1 y 3 (en ambas se utilizó 0.25μM de *Forward*). Todos estos resultados, se pudieron observar también, en los datos crudos de Cts promedio resumidos en la tabla 38, en la que además se calculó la desviación estándar de los replicados de cada uno de los puntos/ combinación de cebadores.

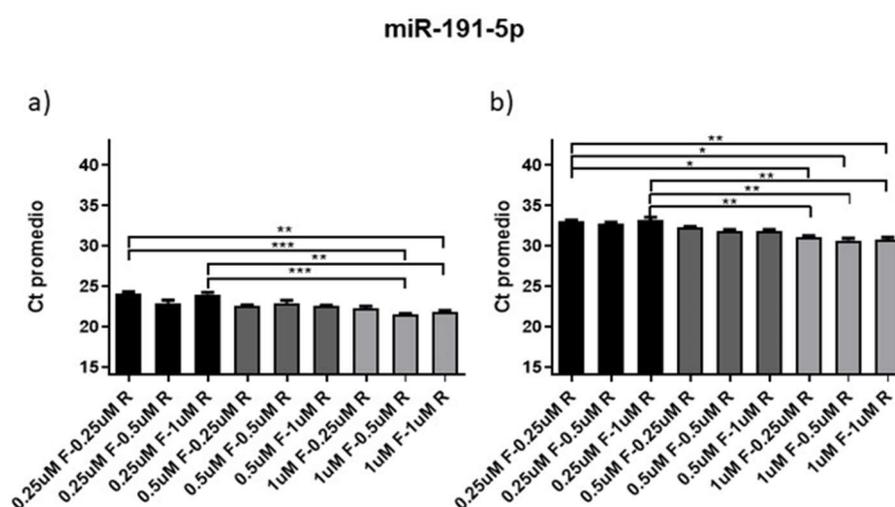


Figura 23. Resultados obtenidos en la optimización de concentración de cebadores *Forward* y *Reverse* del miR-191-5p utilizando la cantidad de a) 10⁷ y b) 10⁵ copias de oligo mímico de este miARN. En el cálculo estadístico se aplicó el test de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post-hoc de Dunn. *p valor < 0.05, **p valor < 0.01, ***p valor < 0.001.

Tabla 38. Valores Ct promedio y desviación estándar calculadas con los datos crudos de los replicados obtenidos de las cantidades de 10^7 y 10^5 copias de oligo mímico del miR-191-5p. Se muestran los resultados obtenidos evaluando 9 combinaciones de concentraciones de F y R distintas.

	Cond.1	Cond.2	Cond.3	Cond.4	Cond.5	Cond.6	Cond.7	Cond.8	Cond.9
Ct_p 10⁷	24,06	22,94	23,99	22,57	22,93	22,54	22,24	21,53	21,74
copias +/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
SD	0,60	0,83	0,62	0,31	0,77	0,24	0,72	0,22	0,64
Ct_p 10⁵	32,99	32,66	33,23	32,21	31,80	31,78	31,10	30,65	30,76
copias +/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
SD	0,46	0,60	0,76	0,47	0,55	0,49	0,44	0,55	0,66

Respecto a los resultados obtenidos en las curvas de *melting*, se formaron dímeros de cebadores en los NTCs de las condiciones 7-9, en las cuales se utilizó $1\mu\text{M}$ de *Forward*. En el caso de la condición $0.25\mu\text{M}$ F y $1\mu\text{M}$ R (Condición 3) también se observaron productos inespecíficos en dos de los replicados de NTC. Estos productos tienen una T_m muy cercana a la del producto específico. Para más detalles consultar el anexo 11.

Sin embargo, se observó un único pico en las condiciones 1, 2, 4 y 5. Atendiendo a estos resultados, y con el objetivo de homogenizar las condiciones para todos los miARNs, se determinó que la concentración óptima de cebadores para el miR-191-5p fue concentración equimolar de $0.5\mu\text{M}$ de F y $0.5\mu\text{M}$ de R, ya que los valores de Ct no mostraron, en ninguna de las cantidades estudiadas, diferencias estadísticamente significativas con las condiciones en las que se obtuvieron los mejores resultados de sensibilidad (condición 7-9). Además, en estas últimas condiciones, como ya se ha comentado, se formaron productos inespecíficos. En las condiciones 1, 2 y 4 se observaron valores de Ct más altos, aunque únicamente se observó formación de un solo pico en las *melting*. Aunque en la condición 5 los valores de SD no fueron los más bajos, es esta condición en la que se cumplieron todos los criterios establecidos para que una combinación de cebadores con una concentración dada se pueda dar por optimizada.

En general, la sensibilidad fue menor en las condiciones 1-3. Los valores de Ct disminuyeron en las condiciones 6-9 en detrimento de la formación de productos inespecíficos visibles con SYBR Green en los NTCs, principalmente en las condiciones 7-9 en las que se utilizó $1\mu\text{M}$ de *Forward*. Este comportamiento no ocurrió, como ya se ha comentado, en el miR-1306-3p en el que los dímeros de cebadores se formaron en todas las condiciones. Por ello, se decidió para todos los miARNs fijar como concentración óptima de cebadores F y R a $0.5\mu\text{M}$.

4.2.3.3. Optimización de concentración de sonda

Con las concentraciones equimolares de *Forward* y *Reverse* de $0.5\mu\text{M}$ definidas como óptimas en el apartado anterior, el paso siguiente fue la optimización de la concentración de sonda. Para ello se probaron las concentraciones de $0.1\mu\text{M}$, $0.2\mu\text{M}$ y $0.3\mu\text{M}$.

La figura 24 muestra los resultados obtenidos con el oligo mímico del miR-122-5p, evaluando las cantidades de 10^7 copias y 10^5 copias figura 24a y figura 24b, respectivamente. En ambas, los valores de Ct aumentaron a medida que se incrementó la concentración de sonda. Con la cantidad de 10^7 copias de oligo mímico los valores de Ct fueron de 22.9, 23.4 y 23.7 ciclos con

concentraciones de sonda de 0.1 μM , 0.2 μM y 0.3 μM , respectivamente. Con la cantidad de 10^5 copias de oligo mímico, y siguiendo el mismo orden de concentraciones los valores de Ct obtenidos fueron: 29.6, 29.9, 30.5 ciclos.

En ambos casos, se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon las concentraciones de 0.1 μM y 0.3 μM de sonda.

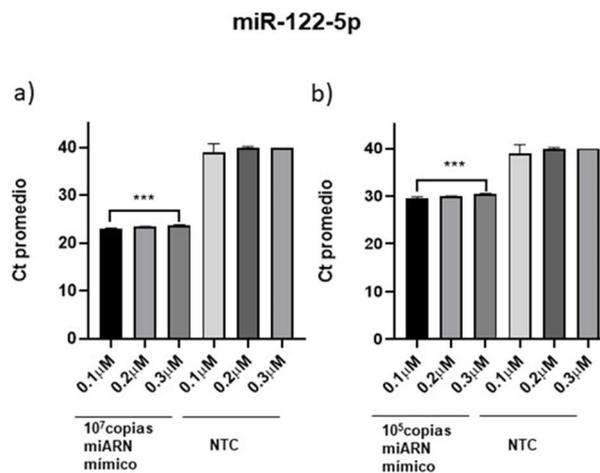


Figura 24. Resultados obtenidos del miR-122-5p al evaluar distintas concentraciones de sonda y las cantidades de oligo mímico de a) 10^7 y b) 10^5 . Se aplicó el test de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post-hoc de Dunn. ***p valor < 0.001.

Por lo que respecta al miR-223-5p, el comportamiento que siguió fue el mismo que el descrito para el miR-122-5p. Los resultados obtenidos se resumen en la figura 25. En ellos se puede observar cómo se alcanzó mayor sensibilidad con la concentración de sonda de 0.1 μM . La sensibilidad disminuyó ligeramente a medida que aumentó la concentración de sonda. En el caso de 10^7 copias los valores de Ct promedio, (concentraciones crecientes de concentración de sonda), fueron 22.8, 23.0 y 24.4, observándose diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones extremas de sonda estudiadas (figura 25a). Por otro lado, con la cantidad de 10^5 copias de oligo mímico de este miARN los valores de Ct promedio fueron 29.4, 29.5, 29.9 ciclos (0.1 μM , 0.2 μM y 0.3 μM , respectivamente) (figura 25b).

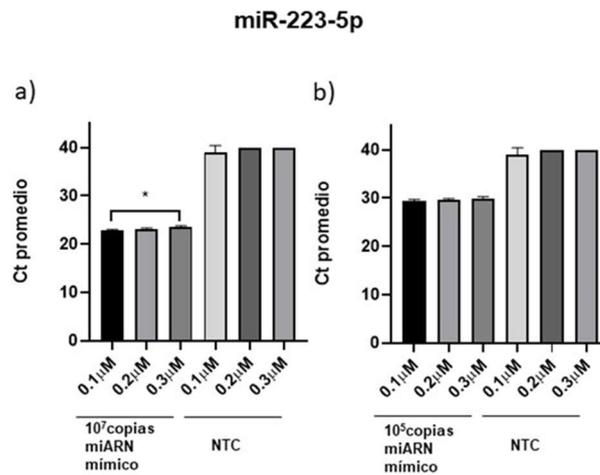


Figura 25. Resultados obtenidos del miR-223-5p al evaluar distintas concentraciones de sonda y las cantidades de oligo mímico de a) 10⁷ y b) 10⁵. Se aplicó el test de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post-hoc de Dunn. *p valor < 0.05.

En el caso del miR-1306-3p se observó un ligero incremento en los valores de Ct a medida que aumentó la concentración de sonda, tanto en 10⁷ copias como en 10⁵ copias, ver figura 26a y 26b, respectivamente. Solamente se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de sonda de 0.1 μM y 0.3 μM en la cantidad de 10⁵ copias (figura 26b). En esta cantidad, los valores de Ct obtenidos para cada una de las concentraciones evaluadas, siguiendo un orden creciente, fueron 28.4, 28.6 y 28.8 ciclos. En el caso de la cantidad de 10⁷ copias del oligo mímico, los valores de Ct, siguiendo el mismo orden de concentraciones, fueron 21.7, 21.9 y 22.1 ciclos (figura 26a). Se puede observar cómo los valores de Ct del NTC al utilizar sonda aumentaron hasta 40. Por tanto, en ambas cantidades el comportamiento fue el mismo, alcanzándose mejores resultados en cuanto a sensibilidad con 0.1 μM de sonda.

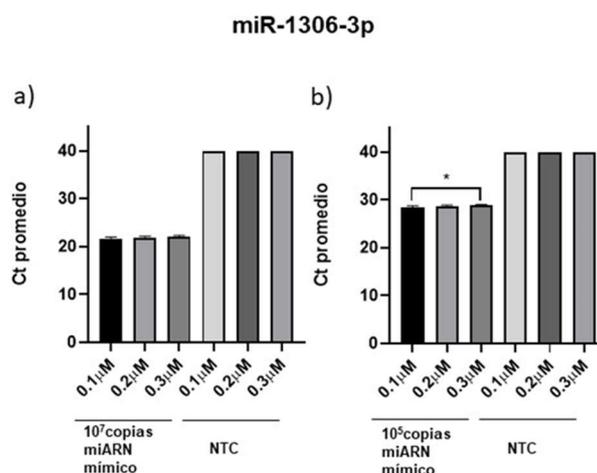


Figura 26. Resultados obtenidos del miR-1306-3p al evaluar distintas concentraciones de sonda y las cantidades de oligo mímico de a) 10⁷ y b) 10⁵. Se aplicó el test de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post-hoc de Dunn. *p valor < 0.05.

Finalmente, los resultados obtenidos con el miR-191-5p siguieron el mismo comportamiento que el resto. A menor concentración de sonda, menor valor de Ct, mayor sensibilidad. Este comportamiento, como cabría esperar, se reprodujo en las dos cantidades de oligo mimico estudiadas (figura 27). En el caso de 10^7 copias de oligo mimico, los valores de Ct promedio fueron 25.3, 25.8 y 26.1 ciclos para las concentraciones de sonda de 0.1 μ M, 0.2 μ M y 0.3 μ M, respectivamente (figura 27a). Siguiendo este mismo orden, para las cantidades de 10^5 copias los valores de Ct fueron 32.3, 32.7 y 33.1 ciclos, observándose diferencias estadísticamente significativas en ambas cantidades de oligo mimico estudiadas, entre las concentraciones de 0.1 μ M y 0.3 μ M de sonda (figura 27b).

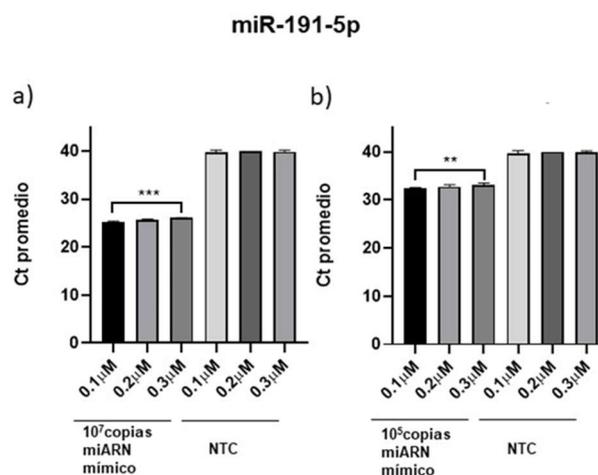


Figura 27. Resultados obtenidos del miR-191-5p al evaluar distintas concentraciones de sonda y las cantidades de oligo mimico de a) 10^7 y b) 10^5 . Se aplicó el test de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post-hoc de Dunn. **p valor < 0.01, ***p valor < 0.001.

4.2.3.4. Validación de la qPCR

Con los parámetros ya optimizados y definidos de Ta, concentración de cebadores *Forward* y *Reverse* y la concentración de sonda, se procedió a realizar la validación de la qPCR mediante curvas de calibrado.

Uno de los principales parámetros analíticos de calidad de la PCR para tener en cuenta, es la pendiente de la recta, la cual se obtiene al representar los valores de Ct frente al log10 del número de copias de oligo mimico. En todos los miARNs estudiados la pendiente promedio estuvo entre -3.4 y -3.8 (ver tablas 39, 40, 41 y 42).

Puesto que el valor de eficiencia es dependiente de la pendiente de la recta, se observó que los valores de eficiencia promedio en todos los miARNs fueron superiores al 90%, siendo cercanos al 100% en los miARNs miR-122-5p, miR-223-5p y miR-1306-3p. Estos resultados indicaron que la PCR estaba optimizada, ya que se mantuvo la proporción entre punto y punto de la curva de 3.3 Cts.

Respecto a los Cts se observó que, para cada uno de los puntos de la curva, los valores de Cts fueron similares en los miARNs miR-122-5p y miR-223-5p (Tabla 39 y Tabla 40, respectivamente), siendo ligeramente más altos para el miR-191-5p (Tabla 41). Sin embargo, si se comparan estos resultados con los obtenidos para el miR-1306-3p se observó mayor sensibilidad, Cts menores (Tabla 42), en las rectas de calibración de este miARN. Como cabría esperar, en general, para cada miARN, la SD entre los replicados de las tres rectas para un mismo punto aumentó a medida que disminuyó la cantidad de oligo mímico. Este fenómeno se observó en el miR-122-5p y el miR-1306-3p y (ver Tabla 39 y Tabla 42 respectivamente), pero no en el caso de miR-223-5p y miR-191-5p (Tabla 40 y Tabla 41 respectivamente).

Finalmente, por lo que respecta al valor de R^2 , en los cuatros miARNs estudiados las curvas siguieron un ajuste lineal, cuyo valor de R^2 promedio fue superior a 0.990, considerándose este valor como un buen indicador de la correlación (Raymaekers et al., 2009).

Tabla 39. Resultados de las curvas de calibrado obtenidas en el proceso de validación de la etapa de qPCR del miR-122-5p y los parámetros analíticos de pendiente, eficiencia y R^2 .

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Media (Ct)	SD
1,15E+07	22,61	22,71	22,84	22,72	0,12
1,15E+06	26,07	25,76	26,50	26,11	0,37
1,15E+05	29,49	29,36	30,02	29,62	0,35
1,15E+04	32,94	32,77	33,76	33,16	0,53
1,15E+03	36,59	37,26		36,93	0,47
0 (NTC)		38,82	40	39,41	0,83
				Media	%CV
Pendiente LightCycler	-3,398	-3,365	-3,617	-3,460	3,96
Eficiencia LightCycler (%)	98,45	99,1	94,5	97,35	2,56
R^2	0,9999	0,9954	0,9999	0,9984	0,26

Tabla 40. Resultados de las curvas de calibrado obtenidas en el proceso de validación de la etapa de qPCR del miR-223-5p y los parámetros analíticos de pendiente, eficiencia y R².

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Media (Ct)	SD
1,11E+07	22,19	22,24	22,27	22,23	0,04
1,11E+06	25,78	25,79	25,83	25,80	0,03
1,11E+05	28,95	29,24	29,50	29,23	0,28
1,11E+04	32,69	32,85	32,99	32,85	0,15
1,11E+03	35,76	35,86	36,03	35,88	0,14
0 (NTC)			40,00	40,00	0,00
				Media	%CV
Pendiente LightCycler	-3,418	-3,517	-3,638	-3,524	3,13
Eficiencia LightCycler (%)	98,05	96,25	94,15	96,15	2,03
R ²	0,9992	0,9991	0,9988	0,9990	0,021

Tabla 41. Resultados de las curvas de calibrado obtenidas en el proceso de validación de la etapa de qPCR del miR-191-5p y los parámetros analíticos de pendiente, eficiencia y R².

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Media (Ct)	SD
1,14E+07	25,17	26,01	25,21	25,46	0,47
1,14E+06	29,21	29,07	28,85	29,04	0,18
1,14E+05	32,55	32,72	32,79	32,69	0,13
1,14E+04	37,52	36,32	36,83	36,89	0,60
1,14E+03	39,64	39,18	38,98	39,27	0,34
0 (NTC)					
				Media	%CV
Pendiente ajustada LightCycler	-4,077	-3,469	-3,857	-3,801	8,10
Eficiencia LightCycler (%)	87,95	97,10	90,85	91,97	5,08
R ²	0,9896	0,9983	0,9911	0,9930	0,47

Tabla 42. Resultados de las curvas de calibrado obtenidas en el proceso de validación de la etapa de qPCR del miR-1306-3p y los parámetros analíticos de pendiente, eficiencia y R².

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Media (Ct)	SD
1,12E+07	20,73	20,88	20,62	20,75	0,13
1,12E+06	23,92	24,22	23,73	23,96	0,25
1,12E+05	27,44	27,73	27,22	27,47	0,26
1,12E+04	30,76	31,38	30,84	30,99	0,34
1,12E+03	34,35	35,22	33,96	34,51	0,65
0 (NTC)					
				Media	%CV
Pendiente LightCycler	-3,381	-3,523	-3,406	-3,437	2,21
Eficiencia LightCycler (%)	98,80	96,10	98,30	97,73	1,47
R ²	0,9997	0,9993	0,9993	0,9994	0,023

4.2.4. Optimización de la concentración de cebador de RT

Una vez optimizadas las condiciones de qPCR, se procedió a estudiar la etapa de RT.

De forma general, se empleó un NTC como control negativo, tanto en la matriz de agua como en la de ARN. En este último caso si el miARN estudiado estuviera presente en esta matriz, se observaría amplificación. Por ello, tan sólo se pudo utilizar como control negativo de la reacción para evaluar la presencia de productos inespecíficos el NTC de agua.

Tal como se muestra en la figura 28, en el miARN miR-122-5p, los valores de Ct fueron más bajos cuando se utilizó la concentración de 50nM, observándose un aumento progresivo de los valores de Ct cuando se incrementó la concentración del cebador. En el caso de la matriz de ARN de cerebro, los valores promedios de Cts fueron 24.8, 26.9 y 28.7 utilizando 50nM, 500nM y 1000nM de cebador de RT respectivamente (figura 28a). En el caso de agua los valores de Ct fueron 25.4, 26.6 y 28.0 ciclos con concentraciones de cebador de RT de 50nM, 500nM y 1000nM respectivamente (figura 28b). La semejanza en los valores de Ct para cada una de las concentraciones, mostró que el comportamiento de los cebadores fue el mismo independientemente de la matriz en la que se retrotranscribiese el oligo mímico. Además, en ambas matrices, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones de cebador de RT de 50nM y 1000nM (figura 28).

En el caso de los NTCs en la matriz de agua, en ninguna de las concentraciones de cebador de RT se observó amplificación. El valor obtenido en estas condiciones fue indeterminado. Sin embargo, en los cálculos se asignó el valor de 40 para poder representar gráficamente (figura

28b). En cuanto a los NTCs en la matriz de ARN, los valores de Ct estuvieron por encima de 36 ciclos, sin embargo, los valores aumentaron cuando aumentó la concentración de cebador (figura 28a), igual comportamiento que cuando se añadió el miARN mímico tanto al agua como al ARN (figura 28). Los resultados apuntaron a que el miR-122-5p se encontraba en este ARN de cerebro en concentraciones muy bajas, o cercanas al límite de sensibilidad de los cebadores diseñados para este miARN.

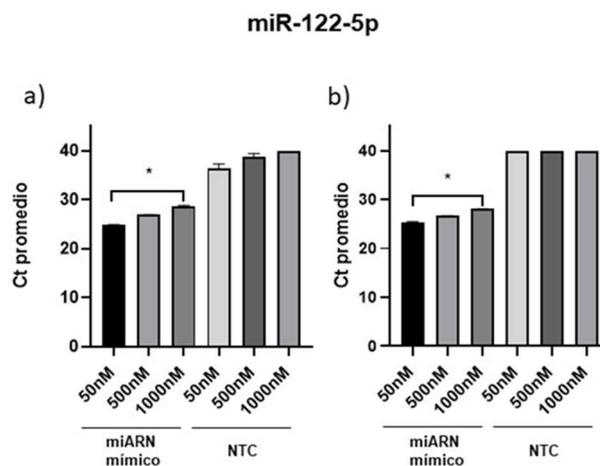


Figura 28. Resultados obtenidos del miR-122-5p al evaluar las concentraciones de cebador de RT de 50nM, 500nM y 1000nM añadiendo 10^7 copias del oligo mímico de este miARN a a) 100ng de ARN de cerebro humano y a b) agua. Se aplicó el test de Kruskal-Wallis seguido de prueba post-hoc de Dunn. *p valor < 0.05.

Por lo que respecta al miR-223-5p (figura 29), el comportamiento fue similar al descrito para el miR-122-5p. Los valores de Ct más bajos se obtuvieron con concentración de cebador de 50nM, independientemente de la matriz, produciéndose un incremento en los valores de Ct a medida que aumentó la concentración del cebador. En el caso de la matriz de ARN los valores de Ct promedio para 50nM, 500nM y 1000nM fueron de 23.9, 26.2 y 27.8 ciclos, respectivamente (figura 29a). En la matriz de agua, siguiendo este mismo orden de concentraciones de cebador de RT, los valores de Ct promedio fueron de 24.2, 26.1 y 28 ciclos (figura 29b). Por tanto, para una determinada concentración de cebador de RT, los Cts no variaron entre las dos matrices estudiadas. Además, se observaron en ambas diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de 50nM de cebador de RT y 1000nM de cebador de RT (figura 29).

Respecto a los NTCs en la matriz de ARN de cerebro, se obtuvo un Ct promedio de 37.90 con la concentración de cebador de 50nM, mientras que las Cts fueron de 40 para las concentraciones de 500nM y 1000nM (figura 29a). En los NTCs en agua, no se observaron tampoco amplificaciones inespecíficas de forma que el equipo reportó los resultados como indeterminados, pero se asignó un valor de Ct de 40 para poder representar gráficamente (figura 29b). Como se ha descrito anteriormente, la sensibilidad fue mayor cuando la concentración de cebador era más baja, independientemente de que el miARN sintético fuese añadido a la matriz de agua o a la matriz de ARN. Los resultados en esta matriz apuntaron a que el miR-223-5p estaba presente en el ARN en concentraciones muy bajas o cercanas a los límites de sensibilidad

resultantes de las condiciones de RT-qPCR fijadas, ya que, en el NTC con 50nM se detectó el *background* presente de este miARN.

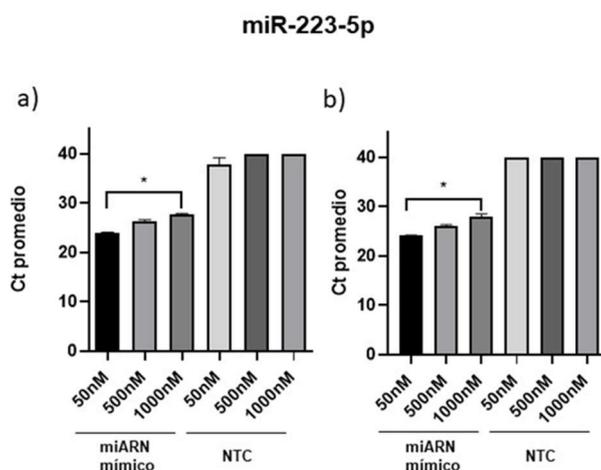


Figura 29. Resultados obtenidos del miR-223-5p al evaluar las concentraciones de cebador de RT de 50nM, 500nM y 1000nM añadiendo 10^7 copias del oligo mímico de este miARN a a) 100ng de ARN de cerebro humano y a b) agua. Se aplicó el test de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post-hoc de Dunn. *p valor < 0.05.

En cambio, el miR-191-5p no siguió exactamente el mismo patrón hasta ahora descrito en los miARNs miR-122-5p y miR-223-5p. Los resultados se resumen en la figura 30. Aunque cuando se fijó la variable, matriz de ARN o agua, y se estudió la variable concentración de cebador, se observó la misma tendencia, aumento de los valores de Cts a medida que la concentración de cebador de RT fue más alta, cuando se fijó la variable concentración de cebador se observó que, los Cts variaban en las dos matrices. De este modo, con 50nM de cebador de RT se obtuvieron Cts de 25.8 en la matriz de ARN mientras que en agua las Cts fueron de 28.2 ciclos. Cuando se aumentó la concentración de cebador de RT hasta 500nM, se observó un comportamiento similar, con Cts de 27.6 cuando el miARN se añadió el ARN de cerebro y Cts 29.7 cuando se hizo en el agua. Finalmente, con la concentración de 1000nM los Cts en la matriz de ARN fueron de 29 ciclos, mientras que en agua se obtuvieron Cts de 30.6 ciclos. En este caso, para una concentración de cebador de RT dada, sí se observaron diferencias en los valores de Ct.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre 50nM de cebador de RT en la matriz de ARN y 1000nM de cebador de RT en agua.

El hecho de que se obtuviesen valores de Cts más bajos cuando se añadió 10^7 copias a 100ng de ARN respecto a cuando se añadieron al agua, junto con los resultados obtenidos en los NTCs de ARN (amplificación en todos ellos mostrando los valores de Ct correspondientes a 100ng de ARN *input*), quedó demostrado que el miR-191-5p está presente en el ARN de cerebro. En los NTCs de ARN de cerebro, los resultados mostraron que a medida que aumentaba la concentración de cebador, aumentaban los valores de Ct. Se reprodujo el mismo comportamiento.

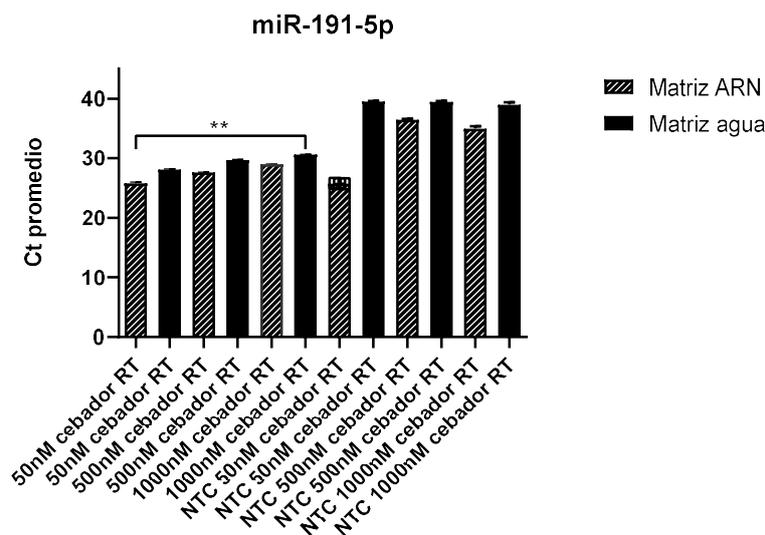


Figura 30. Resultados obtenidos en el experimento de optimización de cebador de RT para el microARN de referencia miR-191-5p. Se añadieron 10^7 copias de oligo mímico de este miARN a 100ng de ARN de cerebro y a agua libre de ARNasas para estudiar las concentraciones de 50nM, 500nM y 1000nM de cebador de RT. Se aplicó el test de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post-hoc de Dunn. **p valor < 0.01.

Por último, la figura 31 muestra los resultados obtenidos para el miARN miR-1306-3p. Para una determinada concentración de cebador de RT, de manera que la variable sea la matriz, los valores de Ct fueron muy similares entre sí, siendo ligeramente más bajos en la matriz de agua. Cuando se analizaron los resultados de manera que la variable fuese la concentración de cebador de RT, se observó que, en la matriz de ARN los valores de Ct promedio fueron 22.1, 21.9, 22.8, 24.5 ciclos con concentraciones de cebador de RT de 25nM, 50nM, 500nM y 1000nM, respectivamente. Siguiendo el mismo orden de concentraciones de cebador, los resultados de Ct promedio obtenidos en la matriz de agua fueron 21.4, 21.2, 22.3 y 23.5 ciclos. Se observó, por tanto, en ambas matrices, un ligero aumento en los valores de Ct a medida que aumentó la concentración de cebador. De hecho, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre 50nM de cebador de RT en agua y 1000nM de cebador de RT en la matriz de ARN de cerebro.

Al igual que el miR-191-5p, el miR-1306-3p también se expresó en este ARN de cerebro ya que se observó amplificación en todos los NTCs. Si, para una determinada concentración de cebador, se comparan los valores de Ct cuando el oligo se añadió al ARN con los valores de Ct del NTC de ARN de cerebro, los valores de Ct disminuyeron ligeramente al añadir el miARN mímico. Es decir, para una matriz de ARN de cerebro y una determinada concentración de cebador de RT, los valores de Cts fueron diferentes cuando se añadió el oligonucleótido mímico a cuando éste no se añadió (se pudo discriminar entre el *background* de miARN que hay en el ARN de cerebro y el oligonucleótido que se añadió).

4.3.1.1. Curvas preparadas sin dilución del cADN

La tabla 44 recopila el promedio de los valores de Ct de cada uno de los puntos de las seis curvas de calibrado obtenidos para cada uno de los miARNs estudio. En la tabla 45 se resumen los parámetros de eficiencia, pendiente y R².

Tabla 44. Valores de Ct promedio de los miARNs miR-122-5p, miR-223-5p, miR-1306-3p y miR-191-5p obtenidos en las curvas de calibrado para cada uno de estos miARNs aplicando la estrategia de no diluir el cADN.

Nº copias totales	miARN			
	miR-122-5p	miR-223-5p	miR-1306-3p	miR-191-5p
1 E+08				23,84
1 E+07	27,06	22,97	22,53	27,18
1 E+06	31,00	26,49	26,07	30,56
1 E+05	34,65	30,02	29,55	34,66
1 E+04	37,57	33,82	31,64	37,05
1 E+03	39,56	37,53	32,31	38,02
1 E+02	39,87	39,33	31,70	
0 (NTC)	39,33	39,67	39,55	38,56

Tabla 45. Resumen de los parámetros analíticos obtenidos en las curvas de calibrado con el miR-122-5p, miR-223-5p, miR-1306-3p y miR-191-5p aplicando la estrategia de no diluir el cADN.

	miARN			
	miR-122-5p	miR-223-5p	miR-1306-3p	miR-191-5p
Pendiente ajustada LightCycler	-3,789	-3,653	-3,334	-3,559
Eficiencia LightCycler (%)	91,91	94,083	100,50	95,75
R ²	0,9948	0,9888	0,9956	0,989

De manera más detallada, se describen a continuación los resultados para cada uno de los miARNs. En primer lugar, por lo que respecta al miR-122-5p (tabla 46), los resultados mostraron que, en los estudios de RT-qPCR con oligo mímico de este miARN y con los diseños de cebadores y sondas específicos para este, el rango dinámico lineal, abarcó desde 10⁷ copias hasta 10⁴ copias, ya que el punto de 10³ copias ya no se diferenció del NTC. Para cada uno de los puntos de la curva de calibrado, la sensibilidad de este miARN fue menor que para los miARNs miR-223-5p y miR-1306-3p (ver tablas 47 y 48 respectivamente). En todos los puntos de la curva de calibrado para el miR-122-5p, la desviación estándar entre los seis replicados fue baja, menor a 0.9.

Tabla 46. Resultados optimización RT-qPCR para el miR-122-5p a través de seis curvas de calibrado a partir de las cuales se calcularon los parámetros de pendiente, eficiencia y R².

n ^o copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media (Ct)	SD
1,15E+07	27,27	26,93	27,21	27,00	26,90	27,07	27,06	0,15
1,15E+06	30,68	31,04	31,10	30,96	31,17	31,03	31,00	0,17
1,15E+05	34,63	34,55	34,98	34,73	34,55	34,47	34,65	0,18
1,15E+04	37,85	37,35	36,95	37,88	37,63	37,80	37,57	0,36
1,15E+03	40,00	40,00	40,00	40,00	39,47	37,89	39,56	0,85
1,15E+02		39,56		40,00	39,94	40,00	39,87	0,21
0 (NTC)		38,88	39,10			40,00	39,33	0,59
							Media	%CV
Pendiente LightCycler	-3,618	-4,034	-3,756	-3,678	-3,912	-3,737	-3,789	4,10
Eficiencia LightCycler (%)	94,50	88,50	92,30	93,50	90,05	92,60	91,91	2,43
R ²	0,9975	0,9924	0,9955	0,9951	0,9986	0,9894	0,9948	0,34

En tres de las seis curvas del miR-122-5p, el valor de NTC resultó ser indeterminado. El valor promedio para esta condición fue cercano a 40, lo cual indicó que no se formaron productos inespecíficos. Respecto a la pendiente, el valor promedio obtenido estuvo cercano a -3.8. Es en este miARN en el que el valor se alejó más del rango recomendado. Los resultados de eficiencia obtenidos tanto de cada una de las curvas, como el valor promedio estuvieron por encima de 90%, a excepción de la curva 2. Por otro lado, respecto al valor de R² se puede observar cómo, en todas las curvas de regresión, el valor obtenido fue superior a 0.99. Los puntos, valores de Ct, se ajustaron a la recta.

La tabla 47 resume los resultados obtenidos con las curvas de calibrado para el miR-223-5p. En este caso el estudio con el oligo mímico indicó que, el rango dinámico lineal abarcó desde 10⁷ copias hasta 10³ copias, 5 puntos. A excepción de la cantidad de 10² copias de oligo mímico, para el resto de las cantidades, la desviación estándar estuvo por debajo de 1. En este miARN tampoco se observaron productos inespecíficos, ya que los resultados de NTC fueron en todos los casos mayores a 39 ciclos.

Si se observan los resultados de pendiente, se puede ver como los valores obtenidos van desde -3.5 hasta -4.0, situándose la media de todos ellos en -3.7. Esto conllevó a que los valores de eficiencia en todas las curvas de calibrado fuesen mayores al 90% (a excepción de la curva 4), obteniéndose un valor promedio del 94%. Respecto a los resultados de R² el promedio calculado fue superior a 0.99, y solamente en una de las curvas de calibrado se observó un valor menor a 0.95.

Tabla 47. Resultados optimización RT-qPCR para el miR-223-5p a través de seis curvas de calibrado a partir de las cuales se calcularon los parámetros de pendiente, eficiencia y R².

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media (Ct)	SD
1,11E+07	22,98	22,13	22,89	22,78	23,50	23,50	22,97	0,51
1,11E+06	26,52	25,83	26,42	26,41	26,86	26,92	26,49	0,39
1,11E+05	29,96	29,80	30,13	30,09	29,95	30,21	30,02	0,15
1,11E+04	34,18	33,28	33,55	33,90	33,93	34,10	33,82	0,34
1,11E+03	37,74	35,89	37,92	38,87	37,35	37,44	37,53	0,97
1,11E+02	40,00	36,00	40,00	40,00	40,00	40,00	39,33	1,63
0 (NTC)		39,00		40,00		40,00	39,67	0,58
							Media	%CV
Pendiente LightCycler	-3,701	-3,531	-3,703	-3,992	-3,487	-3,501	-3,653	5,27
Eficiencia LightCycler (%)	93,15	95,95	93,10	89,00	96,80	96,50	94,083	3,17
R ²	0,9967	0,9919	0,9485	0,9992	0,9980	0,9984	0,9888	2,01

En el caso del miR-1306-3p, el comportamiento fue distinto al de los miARNs miR-122-5p y miR-223-5p. El rango dinámico lineal comprendió 4 puntos, desde 10⁷ copias hasta 10⁴ copias. Sin embargo, si se compara con el resto de miARNs, en este rango lineal se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a sensibilidad. No obstante, los cebadores y sonda diseñados para este miARN no fueron capaces de discriminar entre las cantidades de 10⁴ y 10³ copias de oligo mímico, por lo que en estos dos puntos los valores de Ct resultaron ser iguales. Solamente en la curva 6 estos dos últimos puntos se diferenciaron en 1.7 Cts. Como se puede observar en la tabla 48, la SD calculada para cada uno de los puntos de la curva estuvo por debajo de 0.9. Respecto a los valores de NTC, en 4 de los seis replicados, el resultado obtenido fue reportado como indeterminado. Puesto que solamente se detectaron en 2 de las curvas con Cts de 39 y 40 ciclos, el valor promedio fue de 39.55 ciclos. Otra diferencia significativa respecto a los miARNs descritos hasta ahora es que el valor de eficiencia obtenido fue superior al 100% en tres de las curvas de calibrado. Sin embargo, el valor promedio fue de 100% por lo que el valor de pendiente promedio fue -3.3. Este parámetro, a excepción de la curva 6, estuvo por debajo de -3.5 en el resto de las curvas. Puesto que solamente es en esta curva en la que el valor de pendiente y eficiencia se alejó más del resto, los resultados de coeficiente de variación fueron mayores que para el resto de miARNs. Por el contrario, en el caso de R² se obtuvo el menor coeficiente de variación. Este último criterio de calidad fue superior a 0.99 en los seis replicados. Estos resultados junto con los resultados obtenidos de pendiente y eficiencia permitieron concluir que la RT-qPCR estaba optimizada.

Tabla 48. Resultados optimización RT-qPCR para el miR-1306-3p a través de seis curvas de calibrado a partir de las cuales se calcularon los parámetros de pendiente, eficiencia y R².

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media (Ct)	SD
1,12E+07	22,50	22,63	22,59	22,08	23,56	21,85	22,53	0,59
1,12E+06	25,88	26,12	25,97	25,57	26,85	26,02	26,07	0,43
1,12E+05	29,41	29,51	29,66	29,03	29,90	29,81	29,55	0,31
1,12E+04	31,60	31,65	31,53	31,34	31,41	32,30	31,64	0,34
1,12E+03	32,00	32,40	31,76	31,56	32,15	34,02	32,31	0,88
1,12E+02		31,70					31,70	
0 (NTC)			40,00	39,09			39,55	0,64
							Media	%CV
Pendiente LightCycler	-3,135	-3,490	-3,099	-3,122	-3,171	-3,986	-3,334	10,53
Eficiencia LightCycler (%)	104,20	96,70	105,10	104,55	103,35	89,10	100,50	6,35
R ²	0,9941	0,9956	0,9927	0,9935	0,9983	0,9995	0,9956	0,28

Tabla 49. Resultados optimización RT-qPCR para el miR-191-5p a través de seis curvas de calibrado a partir de las cuales se calcularon los parámetros de pendiente, eficiencia y R².

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media(Ct)	SD
1,14E+08	24,10	23,84	23,71	23,67	23,89	23,83	23,84	0,15
1,14E+07	27,17	27,57	26,67	26,75	27,77	27,14	27,18	0,44
1,14E+06	30,13	30,52	31,02	31,14	30,67	29,90	30,56	0,49
1,14E+05	34,84	34,35	34,73	34,97	34,52	34,57	34,66	0,23
1,14E+04	36,56	36,79	36,96	37,33	37,39	37,25	37,05	0,33
1,14E+03	37,34	37,29	37,98	38,29	40,00	37,24	38,02	1,06
0 (NTC)		38,27	38,85				38,56	0,41
							Media	%CV
Pendiente ajustada LightCycler	-3,537	-3,267	-3,757	-3,839	-3,397	-3,557	-3,559	6,02
Eficiencia LightCycler (%)	95,85	101,20	92,30	91,10	98,50	95,55	95,75	3,93
R ²	0,9823	0,9918	0,9907	0,9907	0,9987	0,9775	0,989	0,76

Finalmente, la tabla superior 49 muestra los resultados obtenidos para el miARN miR-191-5p. En este miARN el rango dinámico lineal abarcó 5 puntos, desde 10⁸ hasta 10³ copias de oligo mímico (valores promedio de Ct desde 23.84 hasta 38.02). La desviación estándar, a excepción del punto 10³ copias, fue inferior a 0.5. En estas curvas de calibrado en las que el cADN se amplificó directamente en la qPCR, no se observó amplificación en el NTC en 4 de las seis curvas de calibrado. En las otras dos, los valores de Ct obtenidos fueron cercanos a 39 ciclos.

Respecto a la pendiente, el valor promedio fue de -3.6 próximo a -3.3, por lo que el promedio de eficiencia resultó ser del 96%. Si, se analizan cada una de las curvas por separado, los resultados de pendiente comprendieron desde -3.3 hasta -3.9, lo cual corresponde con unos valores de eficiencia que comprendieron desde 91% a 101%. El R², último criterio de calidad aquí descrito resultó estar por encima de 0.98 en las seis curvas realizadas.

4.3.1.2. Curvas preparadas con cADN diluido

En este apartado se muestran los resultados obtenidos de las RT-qPCR de las curvas de calibrado preparadas a partir de la dilución 1:10 del cADN obtenido de la RT de cada uno de los puntos. En todos los miARNs el valor de eficiencia promedio de la RT-qPCR fue superior al 88%, lo que significa que en cada ciclo el producto de PCR se amplificó al menos 1.76 veces. Por lo que respecta al valor de pendiente, los valores promedio se encontraron entre -3.57 y -4.04. De forma general, el ajuste de los puntos a la recta, determinado por el valor promedio de R², estuvo entre 0.9985 y 0.9908. En la tabla 50 se resumen estos parámetros para cada uno de los miARNs del estudio. Respecto a los valores de Ct, la tabla 51 recopila los resultados de Ct promedio de las seis curvas de calibrado obtenidos para cada uno de los miARNs.

Tabla 50. Resumen de los parámetros analíticos obtenidos con el miR-122-5p, miR-223-5p, miR-1306-3p y miR-191-5p aplicando la estrategia de diluir el cADN 1:10.

	miARN			
	miR-122-5p	miR-223-5p	miR-1306-3p	miR-191-5p
Pendiente ajustada LightCycler	-4,037	-3,571	-3,664	-3,941
Eficiencia LightCycler (%)	88,60	95,46	94,13	89,70
R ²	0,9906	0,9983	0,9985	0,9908

Tabla 51. Valores de Ct promedio de los miARNs miR-122-5p, miR-223-5p, miR-1306-3p y miR-191-5p obtenidos en las curvas de calibrado para cada uno de estos miARNs aplicando la estrategia de diluir el cADN 1:10.

Nº copias totales	miARN			
	miR-122-5p	miR-223-5p	miR-1306-3p	miR-191-5p
1 E+08				21,34
1 E+07	23,57	22,41	21,06	25,22
1 E+06	28,33	26,11	25,34	28,68
1 E+05	31,54	29,35	28,72	32,94
1 E+04	35,54	33,16	31,87	37,06
1 E+03	39,10	36,20	33,66	38,75
1 E+02		39,70	33,74	
0 (NTC)	39,33	39,67	39,55	38,56

De forma detallada, por lo que respecta al miR-122-5p, en la tabla 52 se puede observar como cuando se añadió la cantidad de 10^2 copias de oligo mímico no hubo amplificación en la PCR en ninguna de las seis curvas de calibrado. El rango dinámico lineal, abarcó desde 10^7 copias hasta 10^4 copias del oligo mímico en cuestión. La SD de los valores de Ct de cada uno de los puntos de la curva de calibrado osciló entre 0.7 y 1.28.

Tabla 52. Parámetros analíticos obtenidos para el miR-122-5p así como los valores de Ct promedio de cada una de las curvas de calibrado aplicando la estrategia de diluir el cADN.

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media (Ct)	SD
1,15E+07	23,86	23,86	24,18	24,03	22,37	23,09	23,57	0,69
1,15E+06	28,25	28,74	28,76	28,64	28,99	26,61	28,33	0,88
1,15E+05	31,74	32,57	32,50	32,38	29,41	30,62	31,54	1,28
1,15E+04	36,04	36,64	36,31	36,45	33,83	33,98	35,54	1,28
1,15E+03	39,38	38,63	39,00	40,00	40,00	37,58	39,10	0,92
1,15E+02								
0 (NTC)		38,88	39,10			40,00	39,33	0,59
							Media	%CV
Pendiente LightCycler	-4,039	-4,241	-4,204	-4,138	-3,913	-3,689	-4,037	5,15
Eficiencia LightCycler (%)	88,42	86,05	86,46	87,25	90,06	93,35	88,60	3,09
R ²	0,9975	0,9979	0,9995	0,9996	0,9498	0,9995	0,9909	2,03

Respecto a los valores de pendiente, los resultados obtenidos se alejaron más del rango recomendado, obteniéndose un valor promedio de -4.0. Por tanto, es en este miARN, miR-122-5p, en el que se obtuvo el valor promedio de eficiencia más bajo, aunque en todos los casos, cercano al 90%. Si comparamos estos resultados con los de la tabla 46, se puede observar cómo, aunque los resultados de sensibilidad fueron mejores cuando el cADN se diluyó 1:10 con agua libre de ARNasas, los parámetros de calidad de pendiente y eficiencia de la RT-qPCR mejoraron cuando el cADN se amplificó directamente en la qPCR (ver tabla 46). Finalmente, por lo que respecta a este miARN, el valor de R² promedio fue superior a 0.99.

Por otro lado, los resultados obtenidos con el miR-223-5p siguiendo la estrategia de diluir el cADN 1:10 (ver tabla 53), fueron similares a los obtenidos cuando el cADN se amplificó directamente en la qPCR (ver tabla 47). Respecto a la sensibilidad, los valores de Ct, para cada uno de los puntos de la curva de calibrado, fueron ligeramente menores cuando el cADN se diluyó. El rango dinámico lineal abarcó también desde 10^7 copias hasta 10^3 copias de oligo mímico del miARN, ya que el punto de 10^2 no se diferenció del NTC. La variabilidad de los replicados, expresada como desviación estándar, resultó ser baja, menor a 0.9.

Tabla 53. Parámetros analíticos obtenidos para el miR-223-5p así como los valores de Ct promedio de cada una de las curvas de calibrado aplicando la estrategia de diluir el cADN.

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media (Ct)	SD
1,11E+07	21,77	22,47	22,24	22,18	23,11	22,66	22,41	0,46
1,11E+06	25,12	25,42	25,90	25,93	27,24	27,03	26,11	0,86
1,11E+05	28,42	29,27	29,34	29,05	30,81	29,21	29,35	0,79
1,11E+04	31,87	33,20	32,97	32,81	34,19	33,89	33,16	0,83
1,11E+03	35,74	36,28	35,89	36,32	36,49	36,46	36,20	0,31
1,11E+02	40,00	39,03	39,49	40,00		40,00	39,70	0,44
0 (NTC)		39,00		40,00		40,00	39,67	0,58
							Media	%CV
Pendiente LightCycler	-3,317	-3,576	-3,59	-3,460	-3,839	-3,641	-3,571	4,91
Eficiencia LightCycler (%)	100,10	95,20	94,96	97,30	91,09	94,11	95,46	3,19
R ²	0,9998	0,9974	0,9995	0,9996	0,9996	0,9939	0,9983	0,23

Siguiendo esta misma línea, los valores de pendiente variaron desde -3.3 hasta -3.8, situándose el valor promedio en -3.6. La eficiencia fue en todos los replicados superior al 90%, obteniéndose un valor promedio del 95%. Finalmente, el R² fue superior en todas las curvas a 0.997, lo cual indicó un ajuste óptimo de los puntos a la recta.

Por otro lado, por lo que respecta a los resultados obtenidos en las curvas de calibrado del miR-1306-3p en las que el cADN se diluyó 1:10 previamente a ser amplificado (tabla 54), se puede observar que en los puntos 10⁷ y 10⁵ copias de oligo mímico, los valores de Ct promedio fueron ligeramente más bajos que estos mismos puntos en la curva de cADN sin diluir (tabla 48). Al igual que ocurrió con el miR-223-5p, el comportamiento del oligo mímico del miARN miR-1306-3p fue similar aplicando las dos estrategias de PCR descritas (ver tabla 48 y 54). Solamente se llegó a detectar el punto de 10² copias en una de las curvas de calibrado en las que el cADN se amplificó directamente y en dos curvas de calibrado en las que el cADN se diluyó previamente. Además, este punto de 10² copia no se diferenció del punto anterior, 10³ copias de oligo mímico del miARN.

El valor de pendiente promedio obtenido, en las curvas de calibrado del miR-1306-3p en las que el cADN se diluyó fue -3.7 (tabla 54), más alto que aplicando para este miARN la otra estrategia de PCR (tabla 48). Sin embargo, atendiendo a la variabilidad, el coeficiente de variación fue mayor con esta última estrategia. Lo mismo ocurrió con los valores de eficiencia, donde se obtuvieron porcentajes más altos y también mayor variabilidad aplicando la estrategia de amplificar directamente el cADN, donde se encontraron valores de pendiente de -3.3 y eficiencia 100, vs pendiente -3.7 y eficiencia 94%, cADN amplificado directamente y cADN diluido, respectivamente.

Tabla 54. Parámetros analíticos obtenidos para el miR-1306-3p así como los valores de Ct promedio de cada una de las curvas de calibrado aplicando la estrategia de diluir el cADN.

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media (Ct)	SD
1,12E+07	20,52	20,57	20,38	20,70	22,10	22,08	21,06	0,81
1,12E+06	24,84	24,78	24,73	24,53	26,80	26,33	25,34	0,97
1,12E+05	28,13	28,22	28,16	27,93	29,87	30,05	28,72	0,96
1,12E+04	31,42	31,46	31,51	31,40	32,55	32,87	31,87	0,66
1,12E+03	33,65	33,69	33,50	33,67	33,61	33,82	33,66	0,11
1,12E+02	33,84			33,64			33,74	0,14
0 (NTC)			40,00	39,09			39,55	0,64
							Media	%CV
Pendiente LightCycler	-3,327	-3,843	-3,923	-3,319	-3,926	-3,647	-3,664	7,73
Eficiencia LightCycler (%)	99,89	91,03	89,92	100,06	89,88	94,01	94,13	5,07
R ²	0,9962	0,9997	0,9992	0,9990	0,9990	0,9981	0,9985	0,13

Respecto al R², en todas las curvas de calibrado fue superior a 0.99, con un CV muy bajo, solamente de 0.23%.

Finalmente, la tabla 55 resume los resultados obtenidos con las curvas de calibrado del miR-191-5p construidas a partir de la dilución 1:10 del cADN obtenido del punto anterior. Al igual que para el resto del miARNs los valores de Ct fueron menores aplicando esta estrategia que amplificando directamente el cADN (ver tabla 49). La variación estándar de los replicados de cada uno de los puntos de la curva estuvo en todos los casos por debajo de 1.2.

Por lo que respecta al valor de pendiente, en todos los replicados fue cercano o ligeramente mayor a -4.0, de tal forma que el valor promedio resultó ser de -3.9. De la misma manera, el porcentaje de eficiencia se encontró alrededor del 90%, siendo el valor promedio de 89.7%. Finalmente, el valor de R² estuvo dentro del rango aceptable de calidad, situándose el valor medio por encima de 0.99. La variación de los replicados en estos tres parámetros de calidad fue menor al 1.8% en todos ellos.

Tabla 55. Parámetros analíticos obtenidos para el miR-191-5p así como los valores de Ct promedio de cada una de las curvas de calibrado aplicando la estrategia de diluir el cADN.

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media(Ct)	SD
1,14E+08	21,10	21,24	21,35	21,83	21,40	21,14	21,34	0,27
1,14E+07	25,21	25,39	24,87	25,00	25,64	25,22	25,22	0,27
1,14E+06	28,14	29,30	28,43	28,43	29,63	28,17	28,68	0,63
1,14E+05	32,09	32,81	32,86	33,48	33,29	33,11	32,94	0,49
1,14E+04	37,14	36,45	36,58	37,52	37,53	37,11	37,06	0,46
1,14E+03	40,00	40,00	37,79	37,82	37,50	39,38	38,75	1,17
0 (NTC)		38,27	38,85				38,56	0,41
							Media	%CV
Pendiente ajustada LightCycler	-3,885	-3,881	-3,902	-4,039	-3,924	-4,017	-3,941	1,76
Eficiencia LightCycler (%)	90,44	90,50	90,21	88,42	89,91	88,70	89,70	1,01
R ²	0,9953	0,9998	0,9909	0,9774	0,9875	0,9936	0,9908	0,78

Con el objetivo de comparar la sensibilidad de cada miARN según la estrategia aplicada, se representaron gráficamente los valores de Ct de las curvas de calibrado mostradas anteriormente frente a logaritmo en base 10 de la cantidad de oligo mímico utilizada como *input* en la RT. La tendencia fue lineal para el miR-122-5p aplicando ambas estrategias. Sin embargo, cuando el producto de cADN no se diluyó, no se separaron los dos últimos puntos por lo que se llegó a la fase de meseta (figura 32a). En el caso de los miARNs miR-223-5p y miR-191-5p todas las curvas siguieron también una distribución lineal figura 32b y 32c, respectivamente. Finalmente, por lo que respecta al miR-1306-3p ambas curvas de calibrado se saturaron en los dos últimos puntos, figura 32d. En todos los miARNs, los valores de Ct resultaron ser más bajos cuando el cADN se diluyó con agua libre de ARNasas previo a la amplificación por PCR, es por ello por lo que es esta condición la que se escogió para continuar con la evaluación del cálculo LOC y LOD. Sin embargo, atendiendo a las tablas anteriormente descritas, y a modo de resumen, a excepción del miR-223-5p, los parámetros analíticos de pendiente y eficiencia fueron más cercanos a -3.3 y a 100%, es decir, a los valores óptimos, en las curvas en las que el cADN se amplificó directamente en la PCR.

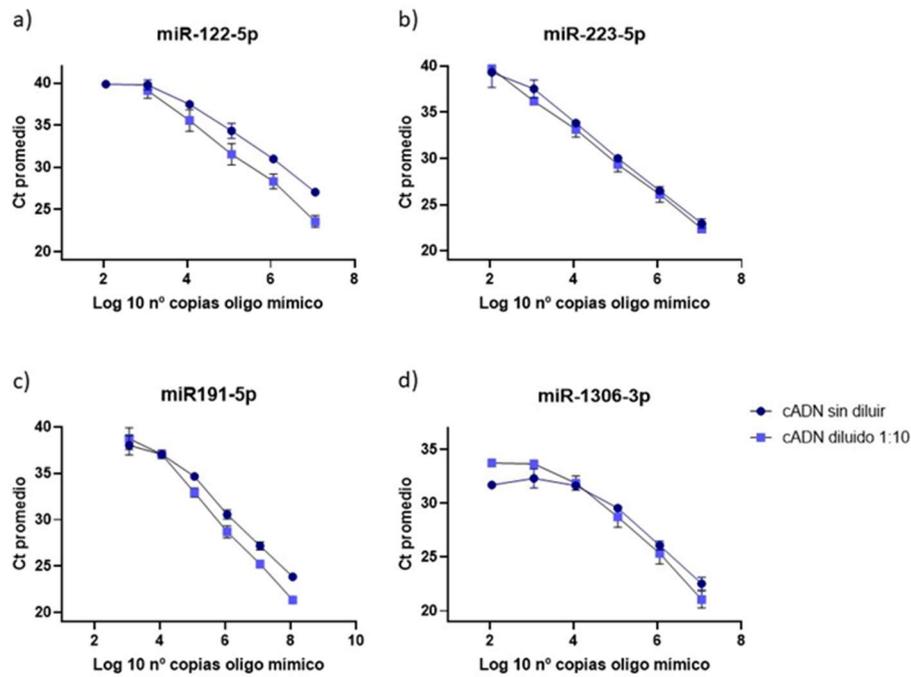


Figura 32. Curvas de calibrado con oligo mímico de los miARNs a) miR-122-5p, b) miR-223-5p, c) miR-191-5p y d) miR-1306-3p en las que el cADN se amplificó directamente en la PCR y este producto de cADN se diluyó con agua libre de ARNasas 1:10 utilizando la tecnología de Roche.

4.3.2. Cálculo del LOC y LOD

Puesto que, en cuanto a sensibilidad, se obtuvieron mejores resultados con las curvas de calibrado en las que el cADN se diluyó 1:10 con agua libre de ARNasas, los cálculos de LOC y LOD se realizaron con los valores de Ct obtenidos de estas curvas.

Las tablas 56-59 recogen, para cada uno de los miARNs, los valores de Ct promedio de cada uno de los puntos de cada curva de calibrado. Se representa también el promedio y la desviación estándar de las seis curvas. En todos los miARNs, como cabría esperar, el LOD es menor que el LOC. En el caso de los miARNs miR-122-5p y miR-191-5p el LOC y LOD estuvo en el rango de 10^3 copias (tabla 56 y 57 respectivamente). Sin embargo, en los miARNs miR-223-5p y miR-1306-3p el LOC y el LOD se situó en el rango de 10^2 copias totales de oligo mímico (tabla 58 y 59, respectivamente).

Aquellos puntos de la curva de calibrado y NTCs en los que el equipo LightCycler480II reportó como indeterminado, se sustituyeron por Ct =40. Estos casos se indican en las tablas 56-59 subrayando el valor de 40.

Tabla 56. Valores de Ct, LOC y LOD del miR-122-5p obtenidos a partir de seis curvas de calibrado preparadas con oligo mímico de este miARN. Los valores de Ct de 40 subrayados corresponden a puntos en los que el equipo LightCycler480II reportó como indeterminado.

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media (Ct)	SD
1,15E+07	23,86	23,86	24,18	24,03	22,37	23,09	23,57	0,69
1,15E+06	28,25	28,74	28,76	28,64	28,99	26,61	28,33	0,88
1,15E+05	31,74	32,57	32,50	32,38	29,41	30,62	31,54	1,28
1,15E+04	36,04	36,64	36,31	36,45	33,83	33,98	35,54	1,28
1,15E+03	39,38	38,63	39,00	40,00	40,00	37,58	39,10	0,92
1,15E+02	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	40,00	0,00
0 (NTC)	<u>40,00</u>	38,88	39,10	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	39,66	0,53
							Media	
LOC							38,36	
Nº copias							2440	
LOD							39,23	
Nº copias							1480	

Tabla 57. Valores de Ct, LOC y LOD del miR-191-5p obtenidos a partir de seis curvas de calibrado preparadas con oligo mímico de este miARN. Los valores de Ct de 40 subrayados corresponden a puntos en los que el equipo LightCycler480II reportó como indeterminado.

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media (Ct)	SD
1,14E+08	21,10	21,24	21,35	21,83	21,40	21,14	21,34	0,27
1,14E+07	25,21	25,39	24,87	25,00	25,64	25,22	25,22	0,27
1,14E+06	28,14	29,30	28,43	28,43	29,63	28,17	28,68	0,63
1,14E+05	32,09	32,81	32,86	33,48	33,29	33,11	32,94	0,49
1,14E+04	37,14	36,45	36,58	37,52	37,53	37,11	37,06	0,46
1,14E+03	40,00	40,00	37,79	37,82	37,50	39,38	38,75	1,17
0 (NTC)	<u>40,00</u>	38,27	38,85	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	39,52	0,77
							Media	
LOC							37,58	
Nº copias							6920	
LOD							38,88	
Nº copias							3230	

Tabla 58. Valores de Ct, LOC y LOD del miR-223-5p obtenidos a partir de seis curvas de calibrado preparadas con oligo mímico de este miARN. Los valores de Ct de 40 subrayados corresponden a puntos en los que el equipo LightCycler480II reportó como indeterminado.

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media (Ct)	SD
1,11E+07	21,77	22,47	22,24	22,18	23,11	22,66	22,41	0,46
1,11E+06	25,12	25,42	25,90	25,93	27,24	27,03	26,11	0,86
1,11E+05	28,42	29,27	29,34	29,05	30,81	29,21	29,35	0,79
1,11E+04	31,87	33,20	32,97	32,81	34,19	33,89	33,16	0,83
1,11E+03	35,74	36,28	35,89	36,32	36,49	36,46	36,20	0,31
1,11E+02	40,00	39,03	39,49	40,00	40,00	40,00	39,75	0,41
0 (NTC)	<u>40,00</u>	39,00	<u>40,00</u>	40,00	<u>40,00</u>	40,00	39,83	0,41
							Media	
LOC							38,69	
Nº copias							270	
LOD							39,46	
Nº copias							170	

Tabla 59. Valores de Ct, LOC y LOD del miR-1306-3p obtenidos a partir de seis curvas de calibrado preparadas con oligo mímico de este miARN. Los valores de Ct de 40 subrayados corresponden a puntos en los que el equipo LightCycler480II reportó como indeterminado.

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media (Ct)	SD
1,12E+07	20,52	20,57	20,38	20,70	22,10	22,08	21,06	0,81
1,12E+06	24,84	24,78	24,73	24,53	26,80	26,33	25,34	0,97
1,12E+05	28,13	28,22	28,16	27,93	29,87	30,05	28,72	0,96
1,12E+04	31,42	31,46	31,51	31,40	32,55	32,87	31,87	0,66
1,12E+03	33,65	33,69	33,50	33,67	33,61	33,82	33,66	0,11
1,12E+02	33,84	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	33,64	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	37,91	3,23
0 (NTC)	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	40,00	39,09	40,00	<u>40,00</u>	39,85	0,37
							Media	
LOC							38,83	
Nº copias							160	
LOD							39,51	
Nº copias							110	

4.3.3. Cálculo del LOC en base al *threshold*

Con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos del cálculo de LOC en Roche (apartado 4.3.2), y, en el caso del miR-1306-3p obtener un LOC que fuese coherente de acuerdo con los valores de Ct de las curvas de calibrado, se calculó, el LOC en base a un umbral, el cual viene también determinado por los blancos (Wolfinger *et al.*, 2018).

Cuando se aplicó este método descrito en el apartado 3.2.4.4 de Material y Métodos, en los miARNs miR-223-5p y miR-191-5p se aplicó el nodo 3, ya que se asumió que los NTCs fueron indeterminados, puesto que en 3 de las curvas de calibrado en el caso del miR-223-5p y en 4 de las curvas de calibrado en el caso del miR-191-5p, no se observó amplificación en los NTCs. Tal como indica este nodo, se multiplicó por 10 el punto siguiente de la curva de calibrado que no había sido medido, es decir 10^2 copias en el caso del miR-191-5p: $10 \times 10^2 = 10^3$ copias totales. En el caso del miR-223-5p, se multiplicó 10 (punto siguiente de la curva de calibrado que no había sido medido) $\times 10 = 100$ copias totales. Concretamente, el LOC sería para este miARN 111 copias ($10 \times 11 = 111$), mientras que en el miR-191-5p el LOC serían 1.136 copias ($10 \times 113,6 = 1136$). Estos resultados son equivalentes a los obtenidos en el apartado anterior (4.3.2) puesto que los valores de LOC están dentro del mismo rango.

Por lo que respecta al miR-122-5p se aplicó el nodo 2; se asumió un valor para NTC indeterminado (en 4 de las curvas de calibrado no se detectó el NTC), no detectándose tampoco el último punto de la curva. Este nodo indica que, se multiplica por 10 el punto más alto de la curva de calibrado que se reporta como indeterminado, por tanto, se multiplicó 114,6 copias $\times 10 = 1.146$ siendo este el valor de LOC. Si se observa la tabla de los resultados de las curvas de calibrado se puede ver como los resultados fueron reproducibles. En ambos cálculos el LOC estuvo en el rango de 10^3 copias.

Finalmente, en el caso del miR-1306-3p también se aplicó el nodo 2, ya que, en 3 curvas de calibrado, los NTCs y el último punto de la curva, 10^2 copias, fueron indeterminados. Por tanto, se multiplicó este último punto de la recta que no se detectó, 111,8 copias $\times 10 = 1.118$ copias, siendo este el LOC. Mientras que con el cálculo descrito en el apartado 4.3.2, el LOC estuvo en el rango de 10^2 , en este caso los resultados apuntaron un rango más. Atendiendo a la tabla 54 (apartado 4.3.1.2) en la que se muestran los valores de Ct, se puede ver como 10^2 copias solo se detectaron en 2 curvas de calibrado, por tanto, los resultados que aquí se muestran son más coherentes puesto que valor de LOC obtenido estuvo dentro del rango lineal obtenido en todas las curvas de calibrado.

La tabla 60 resume el rango en número de copias de LOD y LOC obtenidos aplicando las distintas estrategias descritas.

Tabla 60. Resultados de LOD y LOC de los miARNs de interés aplicando dos métodos distintos.

miARN	LOD	LOC	
	$Ct_{NTC} - \Delta 1$ (donde $\Delta 1 = (3.3 \times \sigma) / - S$)	$Ct_{NTC} - \Delta 2$ (donde $\Delta 2 = (10 \times \sigma) / - S$)	<i>Threshold</i>
miR-122-5p	10^3	10^3	10^3
miR-223-5p	10^2	10^2	10^2
miR-1306-3p	10^2	10^2	10^3
miR-191-5p	10^3	10^3	10^3

4.3.4. Repetitividad (Variación intraensayo)

La intrareproducibilidad se estudió a nivel analítico con los replicados de cada uno de los puntos de las seis curvas de calibrado.

En el primer caso, se calculó para cada miARN, el promedio de los triplicados de cada punto y la desviación estándar de los mismos. La tabla 61 muestra los resultados obtenidos para el miR-122-5p, observándose una tendencia al aumento de la SD en el punto menos concentrado, 10^3 copias. Es importante destacar que, en el punto de 10^2 copias la desviación estándar igual a cero fue debida a que todos los replicados de los NTCs fueron iguales a 40 (no se muestran los datos en la tabla).

Tabla 61. Resumen variación intraexperimental de cada uno de los puntos de las seis curvas de calibrado para el miR-122-5p.

Referencia estándar (nº copias totales)	Variación intraexperimental (SD)					
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6
1,15E+07	0,16	0,06	0,13	0,15	0,16	0,14
1,15E+06	0,28	0,08	0,04	0,08	0,17	0,16
1,15E+05	0,22	0,28	0,15	0,21	0,30	0,10
1,15E+04	0,28	0,07	0,63	0,65	0,33	0,04
1,15E+03	1,32	1,94	0,28	0,00	0,00	0,17

Las tablas 62, 63 y 64 muestran los valores de desviación estándar calculados para cada uno de los puntos de las curvas de calibrado en los miARNs miR-223-5p, miR-1306-3p y miR-191-5p, respectivamente.

En el caso del miR-223-5p y miR-191-5p se observó también un aumento general de los valores de SD en los dos últimos puntos de la curva de calibrado.

Por lo que respecta al miR-1306-3p, los valores de SD fueron más altos en el punto 10^2 copias. La tabla muestra que, en este último punto, no hubo amplificación en cuatro de las seis curvas (tabla 63).

Tabla 62. Resumen variación intraexperimental de cada uno de los puntos de las seis curvas de calibrado para el miR-223-5p.

Referencia estándar (nº copias totales)	Variación intraexperimental (SD)					
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6
1,11E+07	0,15	0,11	0,09	0,15	0,13	0,08
1,11E+06	0,06	0,10	0,08	0,13	0,10	0,11
1,11E+05	0,18	0,25	0,13	0,09	0,12	0,05
1,11E+04	0,12	0,41	0,15	0,15	0,27	0,32
1,11E+03	0,43	0,13	0,30	0,42	0,37	0,46
1,11E+02	0,00	0,53	0,72	0,00		0,00

Tabla 63. Resumen variación intraexperimental de cada uno de los puntos de las seis curvas de calibrado para el miR-1306-3p.

Referencia estándar (nº copias totales)	Variación intraexperimental (SD)					
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6
1,12E+07	0,13	0,05	0,09	0,03	0,09	0,08
1,12E+06	0,07	0,14	0,14	0,06	0,04	0,09
1,12E+05	0,05	0,08	0,18	0,04	0,16	0,16
1,12E+04	0,06	0,17	0,07	0,19	0,08	0,09
1,12E+03	0,20	0,17	0,19	0,16	0,57	0,21
1,12E+02	0,37			0,21		0,29

Tabla 64. Resumen variación intraexperimental de cada uno de los puntos de las seis curvas de calibrado para el miR-191-5p.

Referencia estándar (nº copias totales)	Variación intraexperimental (SD)					
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6
1,14E+08	0,06	0,12	0,19	0,12	0,19	0,13
1,14E+07	0,17	0,18	0,03	0,03	0,01	0,12
1,14E+06	0,11	0,15	0,33	0,07	0,16	0,09
1,14E+05	0,40	0,07	0,34	0,47	0,17	0,21
1,14E+04	0,80	0,42	0,84	0,40	0,62	0,59
1,14E+03	0,00	0,00	0,81	0,13	0,59	0,59

4.3.5. Reproducibilidad (Variación interensayo)

El estudio de variación interensayo o reproducibilidad, se llevó a cabo también, al igual que en apartado anterior, con las curvas de calibrado utilizadas durante el proceso de optimización de la RT-qPCR.

La tabla 65 muestra los resultados, para cada miARN, del promedio de SD de cada punto de las seis curvas de calibrado. Puesto que los resultados de la variación intraensayo, mostraron valores de SD más grandes con los puntos más diluidos de la curva de calibrado, al calcular el promedio en este apartado, la tendencia que se observó fue la misma. Por tanto, en los miR-122-5p y miR-191-5p la variabilidad resultó ser mayor en los puntos de 10^4 y 10^3 copias totales de oligo mímico. En cambio, en los dos miARNs restantes esto es, miR-223-5p y miR-1306-3p, la variación fue mayor en los puntos de 10^3 y 10^2 copias.

Tabla 65. Tabla resumen de la variación interensayo expresada como el promedio de SD de cada uno de los puntos de las seis curvas de calibrado de los miARNs miR-122-5p, miR-223-5p, miR-1306-3p y miR-191-5p, en el rango de 10^8 a 10^2 copias de oligo mímico.

Referencia estándar (nº copias totales)	Variación interexperimental (SD)			
	miR-122-5p	miR-223-5p	miR-1306-3p	miR-191-5p
1,00E+08				0,13
1,00E+07	0,13	0,12	0,08	0,09
1,00E+06	0,14	0,10	0,09	0,15
1,00E+05	0,21	0,14	0,11	0,27
1,00E+04	0,33	0,24	0,11	0,61
1,00E+03	0,62	0,35	0,25	0,35
1,00E+02		0,25	0,29	

4.4. Evaluación de la RT-qPCR en el equipo QS5 (Thermo Fisher Scientific)

Los criterios de calidad como la eficiencia, pendiente y R^2 de la RT-qPCR se calcularon también para las curvas de calibrado llevadas a cabo con los componentes y el equipo de PCR cuantitativa QS5, considerada como tecnología de referencia. Para ello se aplicó la misma estrategia que en la tecnología de Roche descrita anteriormente. Curvas de calibrado en las que el cADN de la RT se amplificó directamente en la qPCR y curvas preparadas a partir de la dilución del cADN 1:10 con agua libre de ARNasas.

4.4.1. Evaluación de los parámetros de calidad de la RT-qPCR

4.4.1.1. Curvas preparadas sin dilución del cADN

La tabla 66 resume los parámetros de la eficiencia promedio, pendiente promedio y R^2 promedio obtenidos en las seis curvas de calibrado para cada uno de los miARNs estudio. En la tabla 67 se recopilan los valores promedio de Ct para cada uno de los puntos de las curvas de calibrado de cada miARN.

Tabla 66. Resumen de los parámetros analíticos obtenidos con el miR-122-5p, miR-223-5p, miR-1306-3p y miR-191-5p aplicando la estrategia de no diluir el cADN.

	miARN			
	miR-122-5p	miR-223-5p	miR-1306-3p	miR-191-5p
Pendiente ajustada LightCycler	-3,510	-3,363	-3,440	-3,418
Eficiencia LightCycler (%)	93,020	98,462	95,689	96,214
R^2	0,982	0,995	0,994	0,992

Tabla 67. Valores de Ct promedio de los miARNs miR-122-5p, miR-223-5p, miR-1306-3p y miR-191-5p obtenidos en las curvas de calibrado para cada uno de estos miARNs aplicando la estrategia de no diluir el cADN.

Nº copias totales	miARN			
	miR-122-5p	miR-223-5p	miR-1306-3p	miR-191-5p
1 E+08				20,26
1 E+07	22,53	19,43	19,52	24,02
1 E+06	26,17	22,85	23,05	27,87
1 E+05	30,24	26,34	26,52	31,27
1 E+04	33,76	29,96	30,38	34,81
1 E+03	37,13	33,34	33,52	36,98
1 E+02	37,90	35,94	36,49	
0 (NTC)		38,80	39,58	39,46

De forma más detallada, las tablas 68-71 recogen los resultados obtenidos para cada uno de los miARNs.

En primer lugar, por lo que respecta a los resultados obtenidos con el oligo mímico del miR-122-5p, el rango dinámico lineal abarcó 5 puntos, desde 10^7 hasta 10^3 , ya que solamente en tres de las curvas de calibrado amplificó el punto de 10^2 copias, cuyo valor de Ct no se diferenció del punto anterior. En los replicados de cada uno de los puntos la SD fue cercana a 1, con la excepción del punto de 10^3 copias que fue mucho menor ($SD=0.40$). No se observó en ninguna de las curvas la amplificación del NTC. Con respecto a los parámetros de calidad de la RT-qPCR se observó en todos los replicados que los valores de pendiente estaban entre -3.3 y -3.8 por lo que la eficiencia obtenida fue de 84% al 99%, obteniéndose un valor promedio de 93%. Los puntos de las curvas siguieron una distribución lineal obteniéndose un valor promedio de R^2 de 0.98. La variación en estos parámetros de calidad fue notable, obteniéndose % de CV de 4.8 y 6.2 en los valores de pendiente y eficiencia, respectivamente (tabla 68).

Tabla 68. Resumen resultados obtenidos con las curvas de calibrado del miR-122-5p en las que el cADN se amplificó directamente en la PCR.

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media (Ct)	SD
1,15E+07	21,46	21,86	21,99	23,00	22,54	24,33	22,53	1,03
1,15E+06	25,03	25,63	25,46	26,65	26,33	27,95	26,17	1,05
1,15E+05	28,93	29,37	29,32	31,34	31,02	31,46	30,24	1,15
1,15E+04	33,02	33,33	33,44	33,46	33,94	35,37	33,76	0,84
1,15E+03	37,32	36,83	37,29	37,76	36,73	36,85	37,13	0,40
1,15E+02	37,25		37,60	38,85			37,90	0,84
0 (NTC)								
							Media	%CV
Pendiente QuantStudio 5	-3,474	-3,773	-3,351	-3,422	-3,648	-3,390	-3,510	4,72
Eficiencia QuantStudio 5 (%)	94,004	84,095	98,801	96,002	87,969	97,247	93,020	6,20
R^2	0,968	1,000	0,974	0,978	0,986	0,986	0,982	1,14

En segundo lugar, en el caso del miR-223-5p, el rango dinámico lineal abarcó 6 puntos, desde 10^7 copias hasta 10^2 copias totales de oligo mímico (tabla 69). La SD en cada uno de los puntos de la curva estudiados fue igual o menor a 0.6. Por lo que respecta al NTC solamente se observó amplificación a Cts altas en dos de las curvas, mientras que en las cuatro curvas restantes el equipo reportó los resultados cómo indeterminados. En todos los replicados el valor de pendiente fue cercano a -3.3, por lo que el valor promedio obtenido fue de -3.36, y por ello el valor de eficiencia media fue de 98.5%, muy cercano al 100%. En cuanto al ajuste de los puntos a la recta se observó un ajuste lineal en todos los replicados superior a 0.99. En definitiva, en este miARN los parámetros de calidad se acercaron a los valores óptimos.

Tabla 69. Resumen resultados obtenidos con las curvas de calibrado del miR-223-5p en las que el cADN se amplificó directamente en la PCR.

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media (Ct)	SD
1,11E+07	19,37	19,45	19,57	19,24	19,10	19,87	19,43	0,27
1,11E+06	22,88	22,73	22,91	22,82	22,67	23,10	22,85	0,15
1,11E+05	26,03	25,84	25,96	26,72	26,40	27,11	26,34	0,50
1,11E+04	29,66	29,75	29,63	29,95	30,13	30,61	29,96	0,37
1,11E+03	33,57	33,20	33,72	32,89	32,99	33,66	33,34	0,36
1,11E+02	35,46	36,09	36,35	34,99	36,55	36,21	35,94	0,60
0 (NTC)		38,74			38,86		38,80	0,09
							Media	%CV
Pendiente QuantStudio 5	-3,318	-3,385	-3,443	-3,205	-3,484	-3,341	-3,363	2,94
Eficiencia QuantStudio 5 (%)	100,156	97,422	95,188	105,136	93,672	99,198	98,462	4,13
R ²	0,994	0,998	0,997	0,990	0,996	0,994	0,995	0,29

En tercer lugar, siguiendo la misma línea, en la tabla 70 se resumen los resultados obtenidos para el miR-1306-3p, los cuales fueron similares a los del miR-223-5p: el rango dinámico lineal abarcó 6 puntos (10^7 hasta 10^2 copias totales). Los replicados técnicos para cada uno de los puntos con mayor cantidad de oligo mímico fueron muy similares por lo que la SD fue baja, menor a 0.33. Para el resto de los puntos aumentó la variabilidad de los replicados. En el caso del NTC, en la mayoría de las curvas el resultado se reportó como indeterminado, en las curvas restantes el valor obtenido fue igual o muy cercano a 40 ciclos. En relación con los parámetros de la RT-qPCR se observó que los valores de pendiente estuvieron entre -3.3 y -3.7, situándose el valor promedio en -3.44, cuyo valor de eficiencia promedio superó el 95%. En algunos replicados el % de eficiencia se situó por debajo del 93%, mientras que en otros superó ligeramente el 100%, de ahí que el coeficiente de variación calculado fuera superior al 7%. Finalmente, respecto al R², en todas las curvas evaluadas se obtuvieron resultados por encima de 0.99, lo cual indicó un ajuste óptimo de los puntos a la recta.

Tabla 70. Resumen resultados obtenidos con las curvas de calibrado del miR-1306-3p en las que el cADN se amplificó directamente en la PCR.

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media (Ct)	SD
1,12E+07	19,35	19,67	19,62	19,67	19,76	19,07	19,52	0,26
1,12E+06	23,01	23,16	23,29	23,18	23,25	22,44	23,05	0,32
1,12E+05	26,39	26,64	26,78	26,51	26,80	25,96	26,52	0,32
1,12E+04	30,32	30,74	30,31	30,49	30,43	30,00	30,38	0,25
1,12E+03	33,00	33,36	33,70	34,22	34,17	32,63	33,52	0,64
1,12E+02	35,47	35,53	37,23	38,26	37,27	35,15	36,49	1,27
0 (NTC)	39,17	40,00					39,58	0,59
							Media	%CV
Pendiente QuantStudio 5	-3,273	-3,303	-3,510	-3,717	-3,553	-3,286	-3,440	5,28
Eficiencia QuantStudio 5 (%)	102,096	100,796	92,708	85,804	91,191	101,539	95,689	7,06
R ²	0,993	0,990	0,998	0,994	0,995	0,992	0,994	0,27

Finalmente, se evaluó el miR-191-5p en el que el cADN se amplificó directamente en la qPCR. En este miARN el rango dinámico lineal abarcó también 6 puntos, desde 10^8 hasta 10^3 copias de oligo mímico. No se observó amplificación de productos inespecíficos en el NTC ya que, en algunas de las curvas, los valores de Ct fueron cercanos o iguales a 40 ciclos, y en otros se reportó como indeterminado. Para cada uno de los puntos de la curva de calibrado la variabilidad fue baja por lo que la variación estándar calculada fue menor a 0.5. Esta baja variabilidad también se observó cuando se estudió la pendiente de la recta, la eficiencia de la RT-qPCR, así como el R^2 . Los valores de pendiente obtenidos comprendían de -3.4 hasta -3.6, con un valor promedio de -3.4. Por tanto, los valores de eficiencia abarcaron desde el 91% hasta el 99%, cuyo valor promedio se situó en el 96%. Para terminar, con respecto al R^2 se puede observar cómo en todos los replicados el valor obtenido fue mayor a 0.98, y el valor medio resultó ser superior a 0.99 (tabla 71).

Tabla 71. Resumen resultados obtenidos con las curvas de calibrado del miR-191-5p en las que el cADN se amplificó directamente en la PCR.

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media(Ct)	SD
1,14E+08	19,90	20,40	20,09	20,25	20,39	20,50	20,26	0,22
1,14E+07	23,84	23,77	23,76	24,30	24,20	24,24	24,02	0,25
1,14E+06	27,59	27,57	27,68	28,12	27,85	28,42	27,87	0,34
1,14E+05	31,16	31,17	31,12	31,28	31,19	31,69	31,27	0,21
1,14E+04	34,78	34,33	34,49	35,19	35,16	34,95	34,81	0,35
1,14E+03	37,20	37,31	36,97	36,84	36,75	36,83	36,98	0,23
0 (NTC)	39,29		39,10	40,00			39,46	0,47
							Media	%CV
Pendiente QuantStudio 5	-3,548	-3,423	-3,443	-3,369	-3,372	-3,351	-3,418	2,13
Eficiencia QuantStudio 5 (%)	91,349	95,933	95,176	98,064	97,960	98,801	96,214	2,86
R ²	0,995	0,996	0,996	0,989	0,990	0,986	0,992	0,43

4.4.1.2. Curvas preparadas con cADN diluido

La tabla 72 recopila los parámetros de calidad de la RT-qPCR, la pendiente, la eficiencia y el R² promedio obtenidos de las seis curvas de calibrado realizadas para cada miARN y preparadas a partir de la dilución 1:10, con agua libre de ARNasas, del cADN obtenido de la RT. En la tabla 73 se muestran los resultados de Ct promedio correspondientes.

Tabla 72. Resumen de los parámetros analíticos obtenidos con el miR-122-5p, miR-223-5p, miR-1306-3p y miR-191-5p aplicando la estrategia de diluir el cADN 1:10.

	miARN			
	miR-122-5p	miR-223-5p	miR-1306-3p	miR-191-5p
Pendiente ajustada LightCycler	-3,7262	-3,414	-3,571	-3,630
Eficiencia LightCycler (%)	85,567	96,477	90,153	88,700
R ²	0,994	0,995	0,996	0,995

Tabla 73. Valores de Ct promedio de los miARNs miR-122-5p, miR-223-5p, miR-1306-3p y miR-191-5p obtenidos en las curvas de calibrado para cada uno de estos miARNs aplicando la estrategia de diluir el cADN 1:10.

Nº copias totales	miARN			
	miR-122-5p	miR-223-5p	miR-1306-3p	miR-191-5p
1 E+08				20,74
1 E+07	22,69	20,36	20,15	24,49
1 E+06	26,39	23,62	23,88	28,11
1 E+05	30,34	27,23	27,16	31,77
1 E+04	33,77	30,60	30,93	35,50
1 E+03	37,66	33,87	34,71	38,77
1 E+02		37,45	37,99	
0 (NTC)		38,80	39,58	39,46

De forma más detallada se describen a continuación los resultados para cada uno de los miARNs estudio. En primer lugar, respecto al miR-122-5p los resultados se describen en la tabla 74. En general, si se comparan estos resultados con los obtenidos con este miARN en los que el cADN se amplificó directamente en la PCR, se observa que los valores de Ct fueron ligeramente más bajos cuando se aplicó esta última estrategia (ver figura 33a). Además, en esta figura se puede observar cómo no se llegaron a detectar 10^2 copias cuando el cADN se diluyó, pero sí cuando el cADN se amplificó directamente en la PCR. Continuando con los resultados expuestos en la tabla 74, se estableció que el rango dinámico lineal abarcó 5 puntos, desde 10^7 hasta 10^3 copias de oligo mímico, sin amplificación en el NTC. Además, los resultados de pendiente obtenidos, y por tanto de eficiencia, se acercaron más a los óptimos cuando se aplicó la estrategia de amplificar directamente el cADN ya que se obtuvieron valores de -3.5 y 93%, de pendiente y eficiencia, respectivamente (tabla 68). Cuando se aplicó la estrategia de diluir el cADN estos parámetros se situaron en -3.7 y 86%. Sin embargo, el valor de R^2 promedio fue más cercano a 1 cuando el cADN se diluyó 1:10 con agua libre de ARNasas.

Tabla 74. Resultados obtenidos con oligo mímico del miR-122-5p y los parámetros de calidad de eficiencia, pendiente y R^2 de las RT-qPCR.

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media (Ct)	SD
1,15E+07	21,58	21,84	21,76	23,99	23,81	23,19	22,69	1,10
1,15E+06	25,32	25,48	25,45	27,83	27,60	26,64	26,39	1,14
1,15E+05	28,83	29,94	29,78	31,53	30,97	30,97	30,34	1,00
1,15E+04	32,22	32,58	32,71	35,64	35,16	34,30	33,77	1,46
1,15E+03	36,53	37,12	37,61	38,49	38,47	37,71	37,66	0,76
1,15E+02								0,00
0 (NTC)								0,00
							Media	%CV
Pendiente QuantStudio 5	-3,660	-3,749	-3,868	-3,713	-3,697	-3,670	-3,7262	2,05
Eficiencia QuantStudio 5 (%)	87,606	84,809	81,345	85,932	86,422	87,288	85,567	2,68
R^2	0,997	0,993	0,995	0,992	0,993	0,994	0,994	0,18

En el caso del miR-223-5p, el rango dinámico lineal, con la estrategia de diluir el cADN también abarcó 5 puntos (desde 10^7 hasta 10^3 copias de oligo mímico) (tabla 75). Al igual que como ocurrió con el miR-122-5p los valores de Ct para cada uno de los puntos de la curva fueron más bajos cuando el cADN se amplificó directamente en la PCR (figura 33b). Solamente en dos de las curvas se obtuvieron valores de casi 39 Cts en los NTCs, no observándose amplificación en el resto de ellas. Respecto a los parámetros de calidad, el valor de pendiente abarcó en los seis replicados desde -3.2 hasta -3.6, obteniéndose un valor promedio de -3.4. En cuanto a la eficiencia, se obtuvieron resultados desde el 90% hasta el 104%. Cuando se calculó la media se obtuvo un 96% de eficiencia. Estos parámetros de calidad fueron muy similares a los que se obtuvieron para este miARN cuando el cADN se amplificó directamente, acercándose ligeramente más a los resultados óptimos cuando el cADN no se diluyó (tabla 69). En cuanto al ajuste de los puntos a la recta, los resultados obtenidos en ambas estrategias también fueron muy similares.

Tabla 75. Resultados obtenidos con oligo mímico del miR-223-5p y los parámetros de calidad de eficiencia, pendiente y R^2 de las RT-qPCR.

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media (Ct)	SD
1,11E+07	19,41	19,53	19,61	20,94	20,72	21,94	20,36	1,01
1,11E+06	23,19	23,11	23,12	24,03	23,69	24,55	23,62	0,59
1,11E+05	26,39	26,38	26,38	28,15	27,63	28,45	27,23	0,96
1,11E+04	29,95	29,99	30,05	31,14	31,03	31,47	30,60	0,68
1,11E+03	33,33	33,31	33,54	33,94	34,28	34,83	33,87	0,60
1,11E+02	37,68	36,36	36,17	36,90	37,60	40,00	37,45	1,39
0 (NTC)		38,74			38,86		38,80	0,09
							Media	%CV
Pendiente QuantStudio 5	-3,580	-3,382	-3,364	-3,237	-3,417	-3,504	-3,414	3,48
Eficiencia QuantStudio 5 (%)	90,266	97,561	98,278	103,675	96,164	92,918	96,477	4,81
R^2	0,994	0,998	0,996	0,994	0,997	0,990	0,995	0,29

Siguiendo la misma línea, los resultados obtenidos para el miR-1306-3p aplicando la estrategia de diluir el cADN (tabla 76) también mostraron resultados de sensibilidad menor que cuando el cADN se amplificó directamente en la PCR (ver figura 33c). El rango dinámico lineal también comprendió 6 puntos, desde 10^7 hasta 10^2 copias de oligo mímico. Para cada uno de los puntos de la curva, los valores de Ct obtenidos en los seis replicados fueron similares entre sí por lo que la SD, a excepción del punto de 10^2 copias, fue menor a 0.70. Los valores de pendiente abarcaron desde -3.5 hasta -3.7 obteniéndose un valor promedio cercano a -3.6. Por lo tanto, el % de eficiencia fue del 85% hasta el 94% de manera que, al calcular la media, se obtuvo un valor de 90%. Al igual que ocurrió con el miR-122-5p y miR-223-5p descritos hasta el momento, estos dos parámetros de calidad se acercaron más a los óptimos cuando el cADN se amplificó directamente en la PCR. En cuanto al R^2 en ambas estrategias el ajuste de los puntos a la recta estuvo dentro del rango recomendado, siendo en las dos estrategias superior a 0.99.

Finalmente, los resultados obtenidos con el oligo mímico del miR-191-5p en el que el cADN se diluyó 1:10 previamente a la reacción de qPCR, mostraron que el rango dinámico lineal abarcaba 6 puntos, desde 10^8 hasta 10^3 copias totales (tabla 77). Al igual que para el resto de miARNs la sensibilidad fue más baja cuando el cADN se amplificó directamente en la PCR (figura 33d). Siguiendo con los resultados obtenidos en las curvas en las que el cADN se diluyó con agua libre de ARNasas, se observó como los valores de pendiente de las seis curvas de calibrado comprendieron desde -3.5 hasta -3.8, por lo que los % de eficiencia fueron en la mayoría de los casos cercanos al 90%, obteniéndose un valor promedio del 89% aproximadamente. En cada una de las curvas de calibrado los puntos se ajustaron a la recta, un ajuste lineal, por lo que en todas ellas el valor de R^2 fue mayor a 0.99. Al igual que para el resto de miARNs, si se establece la comparación entre las curvas aplicando las dos estrategias, los indicadores de calidad de la PCR se acercaron más a los parámetros óptimos cuando el cADN se amplificó directamente en la PCR.

Tabla 76. Resultados obtenidos con oligo mímico del miR-1306-3p y los parámetros de calidad de eficiencia, pendiente y R^2 de las RT-qPCR.

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media (Ct)	SD
1,12E+07	19,64	20,50	20,19	20,00	20,81	19,74	20,15	0,45
1,12E+06	23,33	23,79	24,32	24,07	24,51	23,29	23,88	0,51
1,12E+05	26,96	27,29	27,55	27,06	27,29	26,81	27,16	0,27
1,12E+04	30,36	30,33	31,22	31,50	31,50	30,67	30,93	0,55
1,12E+03	34,56	35,05	34,11	34,56	35,84	34,13	34,71	0,65
1,12E+02	37,51	37,37		38,36	39,49	37,21	37,99	0,95
0 (NTC)	39,17	40,00					39,58	0,59
							Media	%CV
Pendiente QuantStudio 5	-3,612	-3,510	-3,475	-3,561	-3,737	-3,530	-3,571	2,63
Eficiencia QuantStudio 5 (%)	89,188	92,708	93,989	87,887	85,168	91,979	90,153	3,70
R^2	0,995	0,998	0,996	0,996	0,993	0,998	0,996	0,19

Tabla 77. Resultados obtenidos con oligo mímico del miR-191-5p y los parámetros de calidad de eficiencia, pendiente y R² de las RT-qPCR.

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media(Ct)	SD
1,14E+08	19,56	20,08	20,09	21,62	21,23	21,90	20,74	0,96
1,14E+07	23,22	24,57	24,43	25,13	24,65	24,95	24,49	0,67
1,14E+06	27,05	27,55	27,67	29,00	28,48	28,90	28,11	0,80
1,14E+05	30,63	31,33	31,22	32,74	32,09	32,61	31,77	0,84
1,14E+04	34,83	35,89	35,40	35,70	35,37	35,81	35,50	0,39
1,14E+03	38,18		37,02	39,29	38,12		38,77	1,19
0 (NTC)	39,29		39,10	40,00			39,46	0,47
							Media	%CV
Pendiente QuantStudio 5	-3,735	-3,842	-3,598	-3,555	-3,501	-3,548	-3,630	3,61
Eficiencia QuantStudio 5 (%)	84,995	82,077	89,641	91,101	93,033	91,352	88,700	4,78
R ²	0,998	0,995	0,991	0,993	0,997	0,995	0,995	0,26

En general, los resultados obtenidos con la tecnología y componentes de Thermo Fisher Scientific en el equipo QS5, mostraron mayor sensibilidad cuando el cADN se amplificó directamente en la PCR que cuando el producto de la RT se diluyó 1:10 con agua libre de ARNasas. Del mismo modo, por lo general, los parámetros de calidad de la RT-qPCR también se acercaron más a los de referencia cuando se aplicó esta estrategia.

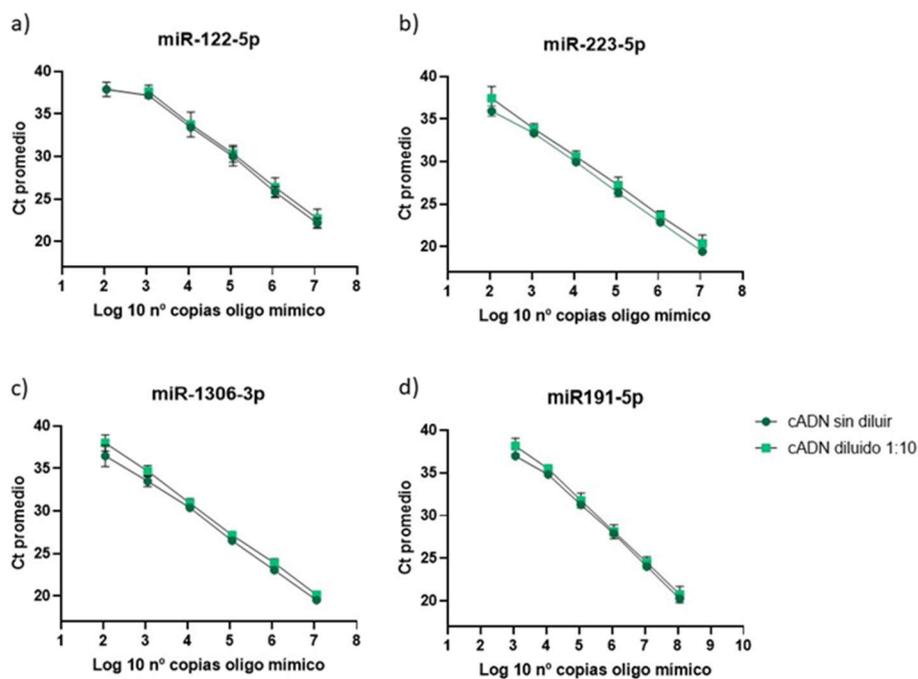


Figura 33. Curvas de calibrado con oligo mímico de los miARNs a) miR-122-5p, b) miR-223-5p, c) miR-1306-3p y d) miR-191-5p en las que el cADN se amplificó directamente en la PCR y este producto de cADN se diluyó con agua libre de ARNasas 1:10 utilizando la tecnología de Thermo Fisher Scientific.

4.4.2. Comparativa de la sensibilidad en los equipos LightCycler 480II (Roche) y QS5 (Thermo Fisher Scientific)

Puesto que los resultados obtenidos con las curvas de calibrado en el sistema ROCHE mostraron una mayor sensibilidad cuando el cADN se diluyó 1:10 con agua libre de ARNasas, se estableció una comparativa de sensibilidad entre ambos equipos de qPCR, ROCHE y QS5, con las curvas en las que el producto de cADN fue diluido. Aunque, como ya se ha expuesto en el apartado anterior los resultados de QS5 mostraron mayor sensibilidad cuando el cADN se utilizó directamente para la PCR, y aun estableciendo la comparativa con ROCHE con las curvas llevadas a cabo con cADN diluido, se observó, para cada uno de los puntos de las curvas de calibrado y en todos los miARNs, valores de Cts más bajos con la tecnología de Thermo Fisher Scientific.

En general, para todos los miARNs y para ambas tecnologías, se observó un comportamiento lineal en el que a medida que aumentó la cantidad de oligo mimico, disminuyó el valor de Ct (ver figura 34). Sin embargo, no se observó este comportamiento en ROCHE con el miARN miR-1306-3p ya que se llegó a una fase de meseta cuando la cantidad de oligo mimico en la reacción fue de 10^3 copias (figura 34c).

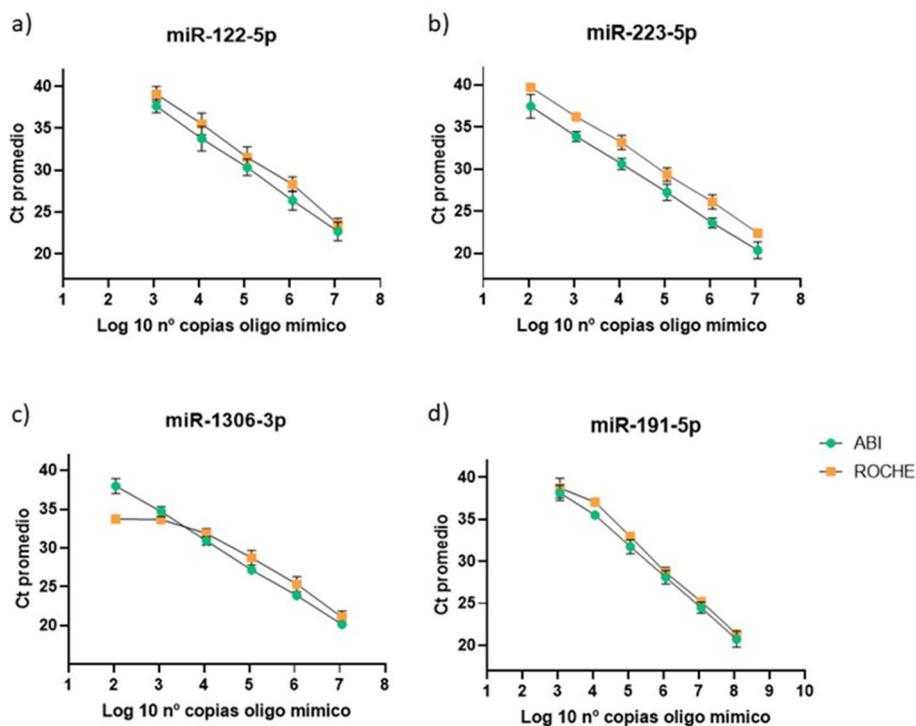


Figura 34. Comparativa de las curvas de calibrado con la tecnología de ROCHE y de Thermo Fisher Scientific de los miARNs a) miR-122-5p, b) miR-223-5p, c) miR-1306-3p y d) miR-191-5p.

4.4.3. Cálculo del LOC y LOD

Para que la comparación con el sistema de referencia que se utilizó, Thermo Fisher Scientific, fuese lo más precisa posible, aun no siendo los mejores resultados de sensibilidad que se

obtuvieron con esta plataforma, el LOC y LOD también se llevaron a cabo con las curvas en las que el cADN había sido diluido.

A excepción del miR-122-5p, en el resto de miARNs el número de copias que se detectaron fue inferior al que se llegó a cuantificar. En este miARN, miR-122-5p, los resultados de LOC y LOD indicaron que se podía llegar a cuantificar y detectar hasta 40 Cts (2.290 copias). Sin embargo, en la tabla 78 se muestra como el último punto de la curva de calibrado, 10^2 copias, no se llegó a detectar en el equipo. De igual modo que se ha descrito en el apartado de cálculo de LOC y LOD en ROCHE, puesto que esta metodología se basa en el NTC, cuando el termociclador QS5 reportó un resultado como indeterminado o Ct >40, se sustituyó éste por Ct de 40 ciclos. Esto también se aplicó para cualquier punto de las curvas de calibrado.

En el caso de los miARNs miR-223-5p y miR-1306-3p, el LOC y LOD estuvieron en el rango de 10^2 copias totales de oligo mímico (ver tablas 79-80). Finalmente, por lo que respecta al miR-191-5p, el LOC estuvo en el rango de 10^3 mientras que el LOD se estableció en 10^2 copias totales de oligo mímico (tabla 81).

Tabla 78. Resultados de las curvas de calibrado y valores de LOC y LOD para el miR-122-5p en la plataforma QS5. Los valores de Ct de 40 subrayados corresponden a puntos en los que el equipo QS5 reportó como indeterminado o Ct > 40.

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media (Ct)	SD
1,15E+07	21,58	21,84	21,76	23,99	23,81	23,19	22,69	1,10
1,15E+06	25,32	25,48	25,45	27,83	27,60	26,64	26,39	1,14
1,15E+05	28,83	29,94	29,78	31,53	30,97	30,97	30,34	1,00
1,15E+04	32,22	32,58	32,71	35,64	35,16	34,30	33,77	1,46
1,15E+03	36,53	37,12	37,61	38,49	38,47	37,71	37,66	0,76
1,15E+02	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	40,00	0,00
0 (NTC)	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	40,00	0,00

	Media
LOC Nº copias	40,00 2290
LOD Nº copias	40,00 2290

Tabla 79. Resultados de las curvas de calibrado y valores de LOC y LOD para el miR-223-5p en la plataforma QS5. Los valores de Ct de 40 subrayados corresponden a puntos en los que el equipo QS5 reportó como indeterminado o Ct> 40.

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media (Ct)	SD
1,11E+07	19,41	19,53	19,61	20,94	20,72	21,94	20,36	1,01
1,11E+06	23,19	23,11	23,12	24,03	23,69	24,55	23,62	0,59
1,11E+05	26,39	26,38	26,38	28,15	27,63	28,45	27,23	0,96
1,11E+04	29,95	29,99	30,05	31,14	31,03	31,47	30,60	0,68
1,11E+03	33,33	33,31	33,54	33,94	34,28	34,83	33,87	0,60
1,11E+02	37,68	36,36	36,17	36,90	37,60	40,00	37,45	1,39
0 (NTC)	<u>40,00</u>	38,74	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	38,86	<u>40,00</u>	39,60	0,62
							Media	
LOC							37,78	
Nº copias							760	
LOD							39	
Nº copias							340	

Tabla 80. Resultados de las curvas de calibrado y valores de LOC y LOD para el miR-1306-3p en la plataforma QS5. Los valores de Ct de 40 subrayados corresponden a puntos en los que el equipo QS5 reportó como indeterminado o Ct> 40.

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media(Ct)	SD
1,12E+07	19,64	20,50	20,19	20,00	20,81	19,74	20,15	0,45
1,12E+06	23,33	23,79	24,32	24,07	24,51	23,29	23,88	0,51
1,12E+05	26,96	27,29	27,55	27,06	27,29	26,81	27,16	0,27
1,12E+04	30,36	30,33	31,22	31,50	31,50	30,67	30,93	0,55
1,12E+03	34,56	35,05	34,11	34,56	35,84	34,13	34,71	0,65
1,12E+02	37,51	37,37	<u>40,00</u>	38,36	39,49	37,21	38,32	1,18
0 (NTC)	39,17	40,00	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	39,86	0,34
							Media	
LOC							38,91	
Nº copias							570	
LOD							39,55	
Nº copias							380	

Tabla 81. Resultados de las curvas de calibrado y valores de LOC y LOD para el miR-191-5p en la plataforma QS5. Los valores de Ct de 40 subrayados corresponden a puntos en los que el equipo QS5 reportó como indeterminado o Ct > 40.

nº copias totales	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Media (Ct)	SD
1,14E+08	19,56	20,08	20,09	21,62	21,23	21,90	20,74	0,96
1,14E+07	23,22	24,57	24,43	25,13	24,65	24,95	24,49	0,67
1,14E+06	27,05	27,55	27,67	29,00	28,48	28,90	28,11	0,80
1,14E+05	30,63	31,33	31,22	32,74	32,09	32,61	31,77	0,84
1,14E+04	34,83	35,89	35,40	35,70	35,37	35,81	35,50	0,39
1,14E+03	38,18	<u>40,00</u>	37,02	39,29	38,12	<u>40,00</u>	38,77	1,19
0 (NTC)	39,29	<u>40,00</u>	39,10	40,00	<u>40,00</u>	<u>40,00</u>	39,73	0,42
							Media	
LOC							38,57	
Nº copias							1320	
LOD							39,35	
Nº copias							810	

4.4.4. Cálculo del LOC en base al *threshold*

Con el objetivo de ver si los resultados eran robustos, y obtener en el caso del miR-122-5p, un valor de LOC coherente en base a los valores de Ct, se aplicó el cálculo del LOC basado en el umbral de los NTCs (Wolfinger *et al.*, 2018).

En el apartado 4.4.3 el LOC obtenido para el miR-122-5p fue de 2.290 copias (rango de 10^3 copias), Cts de 40 ciclos. Según los valores de Ct obtenidos en las curvas de calibrado (ver tabla 78 apartado 4.4.3), no fue coherente que el LOC fuera de Cts de 40 ya que este valor fue sustituido por indeterminado para poder realizar el cálculo. Cuando se aplicó el método descrito por Wolfinger y colaboradores descrito en el apartado 3.2.4.4 de Material y Métodos, el nodo 2 se ajustó a la situación de este miARN: NTC y último punto de la curva (10^2 copias) indeterminado. Se multiplicó este último punto x 10, $114,6 \times 10 = 1.146$ copias, siendo este valor el LOC. Por tanto, aplicando tanto el método basado en el umbral de los NTCs (Wolfinger *et al.*, 2018) como el de Kelnar y colaboradores que también trabajan con miARNs (K Kelnar *et al.*, 2014), el LOC se encontró en el rango de 10^3 copias.

Por lo que respecta al resto de miARNs, se aplicó el nodo 3 (el NTC es indeterminado y detectan todos los puntos estudiados de la curva de calibrado): se observó en el caso del miR-191-5p, 3 curvas de calibrado con NTC=indeterminado, y 4 curvas de calibrado en los miARNs miR-223-5p y miR-1306-3p en los que tampoco se observó amplificación de los NTCs.

En el miR-191-5p se multiplicó el punto siguiente de la curva de calibrado que no se midió por 10, es decir, $113,6 \times 10 = 1.136$ copias. El LOC estuvo en el rango de 10^3 , al igual que el método aplicado por Kelnar y colaboradores (K Kelnar *et al.*, 2014).

Finalmente, en los miARNs miR-223-5p y miR-1306-3p, se siguió la misma estrategia. Se multiplicó por 10 el punto siguiente de la curva que no se midió, 10, por tanto $11,1 \times 10 = 111$ copias totales para el miR-223-5p y $11,2 \times 10 = 112$ copias totales para el miR-1306-3p. En este caso, el LOC estuvo para ambos miARNs en el rango de 10^2 copias. Estos resultados estuvieron de acuerdo con los obtenidos cuando se aplicó el método utilizado por Kelnar y colaboradores (K Kelnar *et al.*, 2014). En la tabla 82 se resumen los resultados obtenidos de LOC y LOD calculados en esta sección y en el apartado 4.4.3 con la tecnología de Thermo Fisher Scientific.

Tabla 82. Rango en número de copias que se cuantifican y detectan de los miARNs de interés con la tecnología de Thermo Fisher Scientific aplicando dos estrategias.

miARN	LOD	LOC	
	$Ct_{NTC} - \Delta 1$ (donde $\Delta 1 = (3.3 \times \sigma) / -S$)	$Ct_{NTC} - \Delta 2$ (donde $\Delta 2 = (10 \times \sigma) / -S$)	Threshold
miR-122-5p	10^3	10^3	10^3
miR-223-5p	10^2	10^2	10^2
miR-1306-3p	10^2	10^2	10^2
miR-191-5p	10^2	10^3	10^3

4.4.5. Comparativa LOC y LOD en los equipos LightCycler 480II (Roche) y QS5 (Thermo Fisher Scientific)

En este apartado se comparó el LOC y el LOD obtenido en los equipos LightCycler 480II (Roche) y QS5 (Thermo Fisher Scientific). Los resultados se resumen en la tabla 83.

Por lo que respecta al LOD se situó en ambas plataformas y para cada uno de los miARNs dentro del mismo rango a excepción del miR-191-5p en el cual se obtuvo para Thermo Fisher Scientific un rango de LOD por debajo del que se obtuvo en Roche (10^2 vs 10^3). En el caso del miR-122-5p el LOD fue de 10^3 copias, en cambio, en los miARNs miR-223-5p y miR-1306-3p el LOD se situó en el rango 10^2 .

Tabla 83. LOC y LOD obtenidos en las plataformas de Roche y Thermo Fisher Scientific para cada uno de los miARNs estudio.

miARN	Roche		Thermo Fisher Scientific	
	LOD	LOC	LOD	LOC
miR-122-5p	10^3	10^3	10^3	10^3
miR-223-5p	10^2	10^2	10^2	10^2
miR-1306-3p	10^2	10^3	10^2	10^2
miR-191-5p	10^3	10^3	10^2	10^3

En el caso del LOC, en el equipo LightCycler 480II (Roche) los resultados de la tabla corresponden a los obtenidos utilizando el método basado en el *threshold* ya que estos resultados estuvieron en concordancia con los valores de Ct obtenidos en las curvas de calibrado. Al igual que con el LOD, el LOC se situó en ambas plataformas y en cada uno de los miARNs dentro del mismo rango. Este comportamiento no se observó en el caso del miR-1306-3p, en el que en el equipo QS5 se obtuvo un LOC un rango por debajo del obtenido con la tecnología Roche (10^2 vs 10^3). El miR-

122-5p y miR-191-5p se obtuvo un LOC de 10^3 , mientras que en el miR-223-5p el LOC estuvo en el rango de 10^2 .

4.5. Estudio de isomiRs

El objetivo que se persiguió en este apartado fue identificar si los miARNs de estudio tenían isoformas, y si era el caso, si estas se encontraban presentes como miARNs circulantes en el plasma sanguíneo. En la tabla 84 se muestra el nombre y secuencia de la isoforma que se identificó para el miARN candidato que se incluye en el kit ScoliPro®, miR-122-5p. Para los miARNs miR-223-5p, miR-1306-3p y miR-191-5p, no se identificaron isoformas que estuviesen descritas en miRbase v22.0.

Tabla 84. Nombre y secuencia de la isoforma del miARN candidato a formar parte del kit ScoliPro®.

miARNs biomarcadores EIA	Isoformas	
	Nombre	Secuencia
hsa-miR-122-5p	hsa-miR-122b-5p	UUUAGUGUGAUAAUGGCGUUUGA
hsa-miR-223-5p	-	-
hsa-miR-1306-3p	-	-
hsa-miR-191-5p	-	-

Por otro lado, en la base de datos MiRmine no se encontraron datos relacionados con la expresión del miARN miR-122b-5p en el plasma sanguíneo. Finalmente, con la base de datos miRandola (versión 2017) no se obtuvieron datos de expresión para esta isoforma en otros fluidos biológicos como son orina y semen. En el análisis bioinformático, por tanto, solamente se identificó isoforma para el miR-122-5p. Sin embargo, esta no se expresaba en el plasma.

4.6. Evaluación de las cantidades de entrada (*input*) de ARN y cADN

En este apartado se muestran los resultados de sensibilidad obtenidos con dos matrices de ARN distintas, FirstChoice® Human Brain Total RNA y ARN total obtenido de un *pool* de plasma comercial humano.

En primer lugar, por lo que respecta a la curva de ARN se resumen los resultados en la figura 35. Los resultados obtenidos en el *pool* de plasma comercial muestran el comportamiento de los miARNs miR-191-5p y miR-122-5p. En esta matriz no amplificaron los miARNs miR-223-5p y miR-1306-3p. Se observó que a medida que aumentó la cantidad de entrada de ARN en la RT, disminuyó el valor de Ct. Por lo que respecta a la curva construida con ARN de cerebro, solamente se muestran los resultados obtenidos en las curvas de calibrado de los miARNs miR-191-5p y miR-1306-3p. El resto de miARNs no se expresaban en esta matriz de cerebro (o en todo caso estaban presentes en concentraciones muy bajas) tal como se demostró en el experimento de optimización de cebador de RT (ver apartado 4.2.4). Estos dos miARNs tuvieron un comportamiento distinto. Mientras que, en el caso del miR-191-5p, se observó una ligera

tendencia al aumento de los valores de Ct a medida que disminuyó la cantidad de ARN *input*, en el caso del miR-1306-3p los valores de Ct permanecieron estáticos

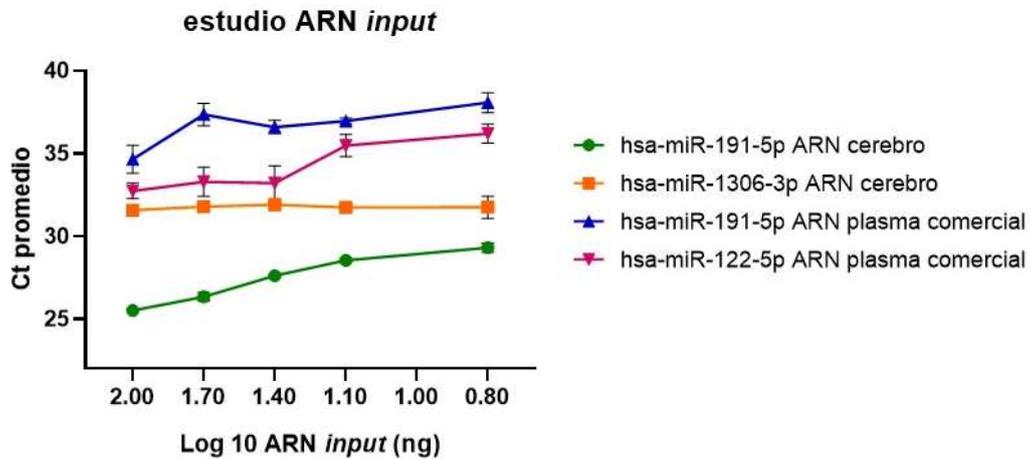


Figura 35. Curvas de calibrado en la que se evaluaron distintas cantidades de ARN obtenido de cerebro y de plasma comercial.

Por lo que respecta a la curva preparada con la dilución del cADN obtenido de la RT de 100ng, se observa en primer lugar, en el caso de la matriz de plasma comercial que los valores de Ct más bajos del miR-122-5p y miR-191-5p se obtuvieron con la dilución 1:10 del cADN (figura 36), siendo cercanos a los obtenidos con 100ng. De estos resultados se infiere que la dilución del cADN a su vez favoreció la dilución de los inhibidores presentes en el cADN. En la matriz de ARN de cerebro se observó una tendencia lineal en el miR-1306-3p y miR-191-5p, es decir, un incremento en los valores de Ct a medida que aumentó la dilución del cADN. Obteniéndose el menor valor de Ct cuando se introdujo en la qPCR el cADN sin diluir.

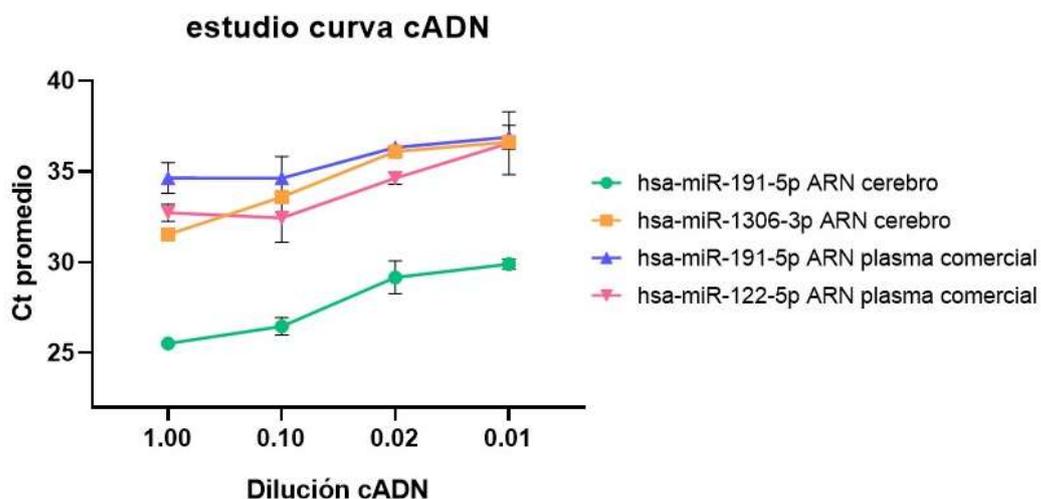


Figura 36. Curvas de calibrado en la que se evaluaron distintas diluciones del cADN.

En el ARN de cerebro, aunque para el miR-191-5p se observó linealidad en las dos curvas de calibrado (curva de ARN y curva con dilución del cADN), si se comparan los valores de Ct de ambas, se observa que los Cts fueron iguales en 50ng de ARN *input* (log10 1.70) que en la dilución 1:10 del cADN de 100ng. Al igual que los valores de Cts obtenidos con 6.25ng (log10 0.80) y los obtenidos al diluir 1:50 del cADN obtenido de 100ng. Estos resultados también reforzaron la idea de la presencia de inhibidores en el ARN, ya comentada en el ARN de plasma comercial.

Con la finalidad de unificar la misma cantidad de ARN *input* en todos los miARNs para facilitar la preparación de las muestras en la RT-qPCR, y dado que en el caso de la matriz de ARN de plasma comercial los valores de Ct apenas variaron cuando se amplificó el cADN obtenido de la RT de 100ng directamente o se diluyó este 1:10, y en la matriz de ARN de cerebro los valores de Ct más bajos se obtuvieron con 100ng de ARN *input*, se realizó una prueba comparativa aplicando estas dos estrategias con muestras de plasma EDTA de pacientes EIA.

4.7. Evaluación de la sensibilidad y especificidad del método de RT-qPCR optimizado en la plataforma LightCycler 480 II (Roche) con muestras de plasma de pacientes

En las muestras de plasma de pacientes de EIA analizadas, los valores de Ct fueron más bajos cuando se utilizó el cADN obtenido directamente de la RT de 100ng de ARN, cuantificado por Nanodrop One que, cuando este producto se diluyó 1:10 con agua libre de ARNasas, observándose en todos los miARNs diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones. La figura 37 muestra los resultados obtenidos en los miARNs miR-122-5p, miR-223-5p, miR-1306-3p, miR-191-5p y Cel-miR-39.

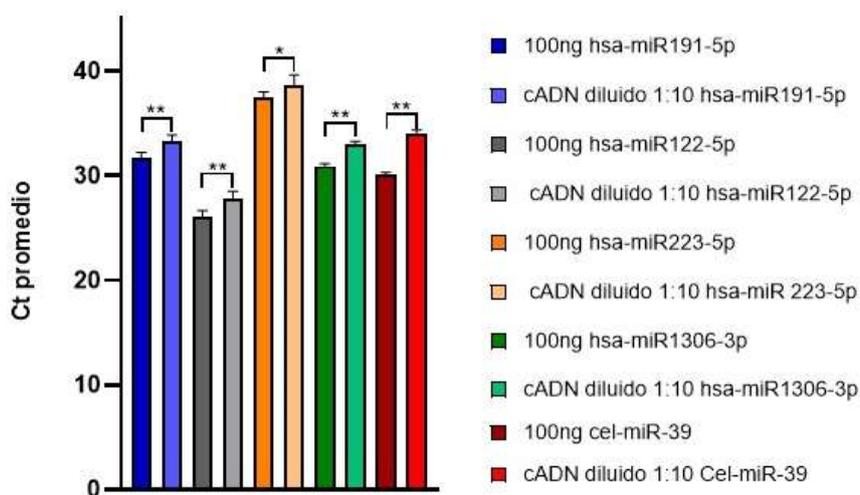


Figura 37. Comparación de la sensibilidad, en base a los valores de Ct, de la estrategia de amplificar directamente el producto de cADN obtenido de 100ng de ARN versus diluir 1:10 este producto de cADN. Se aplicó el test de Mann-Whitney. *p valor < 0.05, **p valor < 0.01.

Sin embargo, puesto que por la experiencia previa en el manejo con muestras de plasma EDTA y en este experimento en concreto con muestras de pacientes EIA, el rendimiento del proceso de extracción estuvo entre 20 y 30 ng/ μ L de ARN total medidos con NanoDrop, se decidió para facilitar el trabajo con las muestras en el kit ScoliPro[®] ajustar a un volumen fijo de 4 μ L, que equivaldrían aproximadamente a 100ng de ARN. Esta decisión fue también en base a que la cuantificación por espectrofotometría no es el método recomendado para microARNs por ello se recomienda que si se utiliza método de cuantificación se utilicen volúmenes constantes de muestra (Moldovan *et al.*, 2014)(Marabita *et al.*, 2016)(Kroh *et al.*, no date)(Abdel Nour and Plaffl, 2020)(McDonald *et al.*, 2011)(Glinge *et al.*, 2017a)(Le Carré, Lamon and Léger, 2014)(El-Khoury *et al.*, 2016)(Kirschner *et al.*, 2011)(Fortunato *et al.*, 2014). De hecho algunos kits IVD basados en miARNs también aplican esta filosofía (*osteomiR TM kit Wet Lab Instruction Manual v3.0 microRNA Biomarkers of Bone Quality TM*, 2020).

4.8. Diseño, desarrollo y fabricación del prototipo del kit basado en la tecnología de RT-qPCR en la plataforma LightCycler480 II (Roche)

4.8.1. Estudio con distintos volúmenes y formatos de placa de PCR

Con el objetivo de establecer si los volúmenes de reacción (RT y qPCR) y el tipo de placa de PCR podían ser escalados a otros formatos de tal manera que en la futura conformación del kit ScoliPro[®] pudiese ser utilizado por el usuario con las herramientas que tuviese en el laboratorio (versatilidad), se estableció comparativa entre distintos volúmenes y placas de PCR de 96 y 384 pocillos.

En primer lugar, por lo que respecta al miR-122-5p, no se observó variación significativa en los valores de Ct cuando se compararon todas las condiciones con la de referencia, condición 1 (RT 20 μ L, qPCR 10 μ L en placa 384pocillos), con la que se llevó a cabo todo el proceso de optimización de la RT-qPCR (figura 38a).

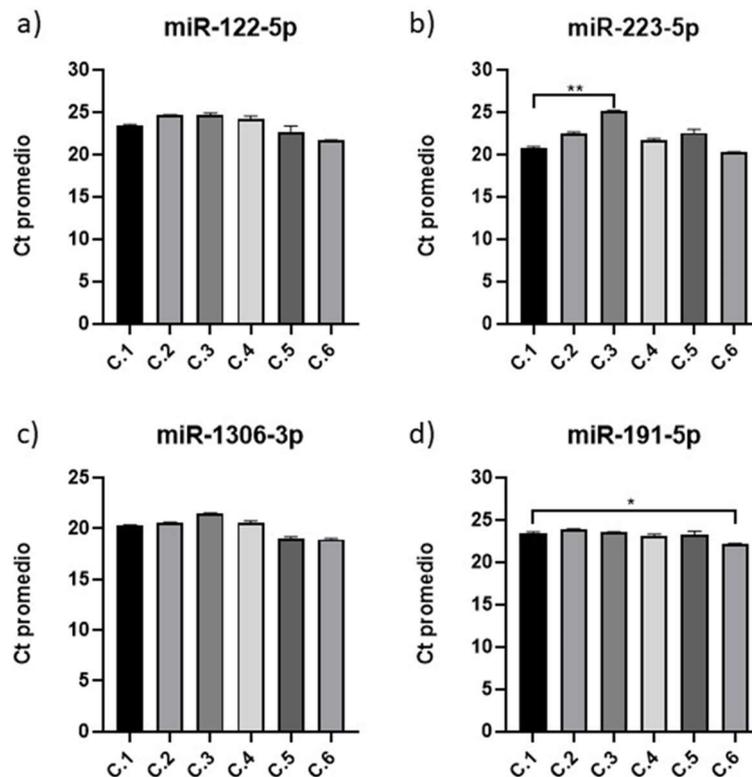


Figura 38. Evaluación de la sensibilidad en distintos volúmenes de RT y qPCR y formatos de placa (96 pocillos y 384 pocillos) con oligos mímicos de los miARNs a) miR-122-5p, b) miR-223-5p, c) miR-1306-3p y d) miR-191-5p. C.1: Condición 1, RT 20 μ L, qPCR 10 μ L en placa 384 pocillos; C.2: Condición 2, RT 20 μ L, qPCR 10 μ L en placa 96 pocillos; C.3: Condición 3, RT 20 μ L, qPCR 20 μ L en placa 96 pocillos utilizando como *template* 2 μ L de cADN; C.4: Condición 4, RT 20 μ L, qPCR 20 μ L en placa 96 pocillos utilizando como *template* 4 μ L de cADN; C.5: Condición 5, RT 10 μ L, qPCR 10 μ L en placa 384 pocillos; C.6: Condición 6, RT 10 μ L, qPCR 10 μ L en placa 96 pocillos. Se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba post-hoc de Dunn. *p valor < 0.05, **p valor < 0.01.

Sin embargo, en el caso del miR-223-5p, sí que se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la condición 1 y la condición 3 (figura 38b). En ambos casos se utilizó un volumen de reacción en la RT de 20 μ L, la diferencia entre ambas radicó en el volumen de PCR y el formato de placa. Sin embargo, al comparar la condición 1 con la condición 4 en la que la única diferencia respecto a la condición 3 fue el volumen de cADN que se utilizó (2 vs 4 μ L), no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Por tanto, en base a estos resultados se descartó para el diseño final del kit, volumen de PCR de 20 μ L utilizando en la reacción 2 μ L de *input* de cADN en placa de 96 pocillos (figura 38b).

Por otro lado, el comportamiento que se observó para el miR-1306-3p fue similar al descrito para el miR-122-5p. Los resultados mostraron que los valores de Ct se mantenían constantes al evaluar las seis condiciones (figura 38c). En base a estos resultados y solamente si se analiza individualmente este miARN, el kit ScoliPro[®] podría ser utilizado indistintamente en todos los volúmenes de reacción de RT y qPCR y formatos de placas de PCR evaluados.

Finalmente, por lo que respecta al miR-191-5p, no se observó variación en los valores de Ct cuando se comparó la condición 1 con las condiciones de 2-5. Sin embargo, a pesar de que las diferencias de Ct promedio entre la condición 1 y 6 eran menores a 1.5 Cts (23.49 +/- 0.13 y

22.15 +/- 0.09 respectivamente), se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ellas. La diferencia entre ambas condiciones fue el volumen de RT y el tipo de placa de PCR, por tanto, analizando solamente este miARN no se podrían escalar estas dos variables (figura 38d).

En resumen, siendo estrictos y analizando los resultados obtenidos de manera conjunta ya que, el kit Scolipro® está conformado por los 4 miARNs aquí descritos más el Cel-miR-39 como control de extracción y posible normalizador, no se podría realizar ningún escalado de manera que el kit se tendría que evaluar en volumen de RT de 20µL y PCR en volumen de reacción de 10µL en placa de 384 pocillos. Sin embargo, puesto que en el miARN endógeno de referencia, la diferencia de Ct entre las condiciones 1 y 6 en las que se observaron diferencias estadísticamente significativas, era menor a 1.5Cts, lo cual podría ser atribuible a la variabilidad técnica inherente en la RT-qPCR, se descartó que esta diferencia fuese debida al volumen y formato de placa (a las variables estudiadas). Por tanto, al descartar estas diferencias y, tener en cuenta solamente las obtenidas en el miR-223-5p, se concluyó que en el futuro desarrollo del kit Scolipro® podrían evaluarse indistintamente un volumen de RT de 10µL o 20µL. La qPCR también se podría realizar con ambos volúmenes, pero sin utilizar en el caso de 20 µL para la placa de PCR, un volumen de 2 µL de cADN. Finalmente, se podrían utilizar indistintamente ambos formatos de placa de PCR.

4.9. Validación del kit Scolipro®

Se realizó un ensayo de monitorización durante 2 años de los pacientes EIA en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia y el Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia.

Definida y validada la integración de los componentes del kit, se procedió a la validación de la función diagnóstica con las muestras de plasma EDTA correspondientes a 52 pacientes de EIA en el tiempo 0, 1 y 2 (inicio del reclutamiento, 6 meses y 12 meses desde la entrada en el estudio, respectivamente). Los niveles de expresión de los miARNs se compararon con 20 muestras de controles sanos, tal como se describe en los apartados 3.2.11.3 a 3.2.11.7.

Por otro lado, para evaluar la capacidad pronóstica del kit de identificar los pacientes que evolucionan a una curvatura mayor durante un año de monitorización en los centros hospitalarios participantes, se estudiaron un total de 40 pacientes de EIA en el tiempo 0 (inicio del estudio), a los 6 y a los 12 meses de seguimiento clínico tal como se describe en los apartados 3.2.11.3 a 3.2.11.6 y 3.2.11.8.

A continuación, se describen los resultados obtenidos de la función diagnóstica y pronóstica del kit Scolipro®.

4.9.1. Función diagnóstica

Para determinar la función diagnóstica del kit Scolipro® se comparó el grupo de pacientes EIA (n= 52) con el grupo control (n= 20). En primer lugar, se compararon las muestras de EIA del tiempo 0. Por lo que respecta a la expresión del miR-122-5p, tanto si se aplicó la estrategia de utilizar como miARN de referencia el miR-191-5p (figura 39a) como si se utilizó la media geométrica de este miARN con el Cel-miR-39 (figura 39b) se observaron diferencias

estadísticamente significativas entre ambos grupos. Este mismo comportamiento se observó en el miR-223-5p. La figura 40a muestra la expresión de este miARN cuando se utilizó el miR-191-5p como miARN de referencia. Del mismo modo, la figura 40b representa la expresión del miR-223-5p pero aplicando la estrategia de normalización utilizando la media geométrica para la normalización. Finalmente, en el caso del miR-1306-3p también se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos estudio. La figura 41 representa la expresión de dicho miARN utilizando el miR-191-5p como normalizador (apartado a) y la media geométrica del control endógeno y exógeno (apartado b). Los tres miARNs biomarcadores evaluados mostraron una mayor expresión en el grupo pacientes que en el grupo control, por ello el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ resultó ser mayor en los casos de EIA que en los controles.

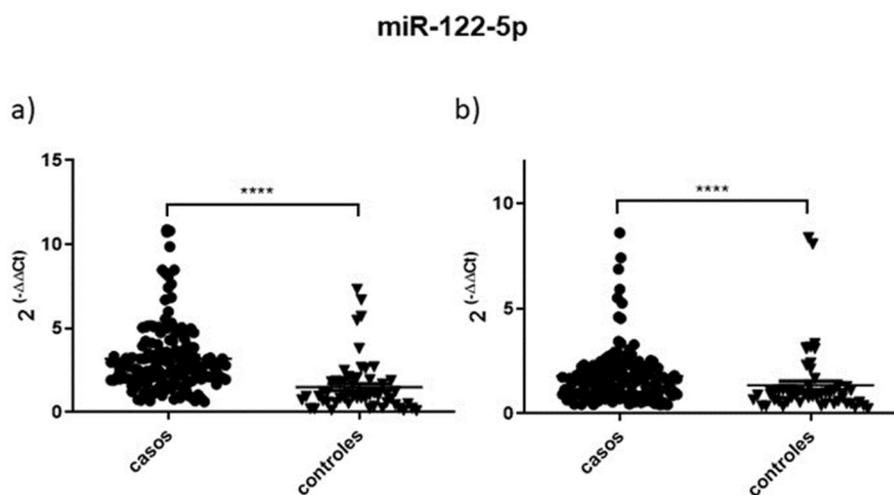


Figura 39. Expresión relativa del miR-122-5p en plasma en grupo pacientes (n= 52), correspondientes al tiempo 0, y grupo control (n= 20) utilizando como normalizador a) miR-191-5p y b) la media geométrica de miR-191-5p y Cel-miR-39. Se aplicó test de Mann-Whitney. ****p valor < 0.0001.

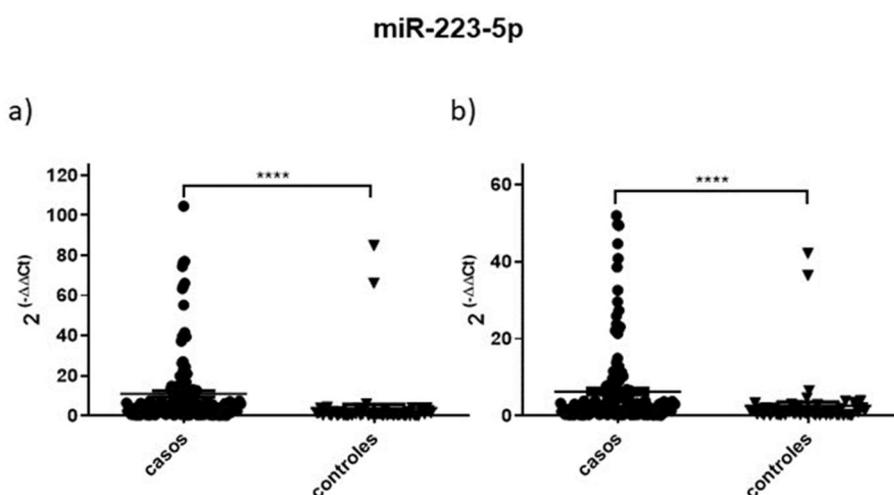


Figura 40. Expresión relativa del miR-223-5p en plasma en grupo pacientes (n= 52), correspondientes al tiempo 0, y grupo control (n= 20) utilizando como normalizador a) miR-191-5p y b) la media geométrica de miR-191-5p y Cel-miR-39. Se aplicó test de Mann-Whitney. ****p valor < 0.0001.

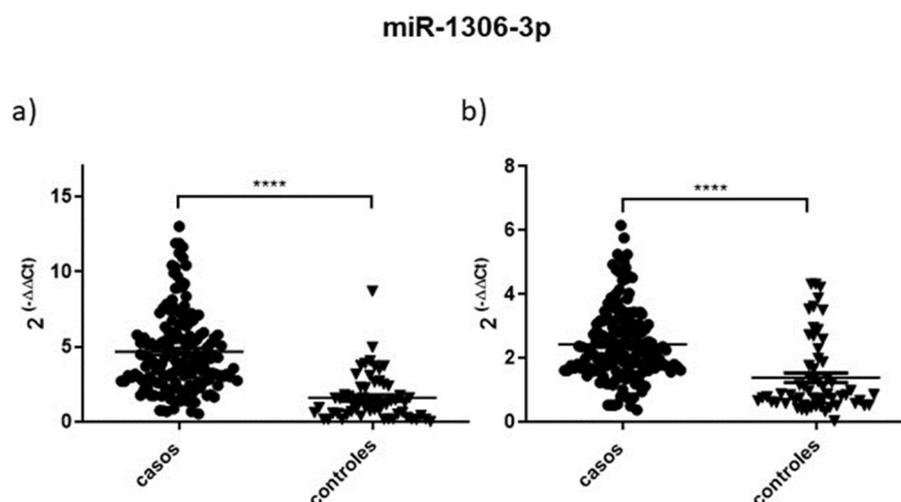


Figura 41. Expresión relativa del miR-1306-3p en plasma en grupo pacientes (n= 52), correspondientes al tiempo 0, y grupo control (n= 20) utilizando como normalizador a) miR-191-5p y b) la media geométrica de miR-191-5p y Cel-miR-39. Se aplicó test de Mann-Whitney. ****p valor < 0.0001.

La tabla 85 resume los resultados obtenidos del análisis estadístico utilizando como miARN de referencia el miR-191-5p y la media geométrica de este miARN con el Cel-miR-39. Para todos los miARNs estudiados la sensibilidad, especificidad, así como el AUC fueron mayores cuando se utilizó el miR-191-5p como normalizador. Por tanto, se utilizó este normalizador en la validación de la función diagnóstico para el resto de los tiempos (t1 y t2) y para la función pronóstica del kit Scolipro®.

Tabla 85. Análisis estadístico de la función diagnóstica de las muestras correspondientes al tiempo 0 utilizando dos estrategias para la normalización de los datos.

miARN interés	miARN referencia	AUC IC 95%	P valor	Valor de Cut off	Sensibilidad	Especificidad
miR-122-5p	miR-191-5p	0.8179 (0.7476-0.8881)	<0.0001	1.89	76.62	77.97
	m.g miR-191-5p y Cel-miR-39	0.6841 (0.5997-0.7685)	<0.0001	1.12	68.18	76.27
miR-223-5p	miR-191-5p	0.8041 (0.7388-0.8694)	<0.0001	2.49	72.92	79.31
	m.g miR-191-5p y Cel-miR-39	0.7184 (0.6431-0.7937)	<0.0001	1.51	68.24	70.69
miR-1306-3p	miR-191-5p	0.8747 (0.8214-0.9280)	<0.0001	2.02	85.90	72.88
	m.g miR-191-5p y Cel-miR-39	0.7752 (0.6937-0.8567)	<0.0001	1.40	85.26	71.67

En la figura 42 se muestran las curvas ROC obtenidas en estos miARNs utilizando como normalizador el miR-191-5p.

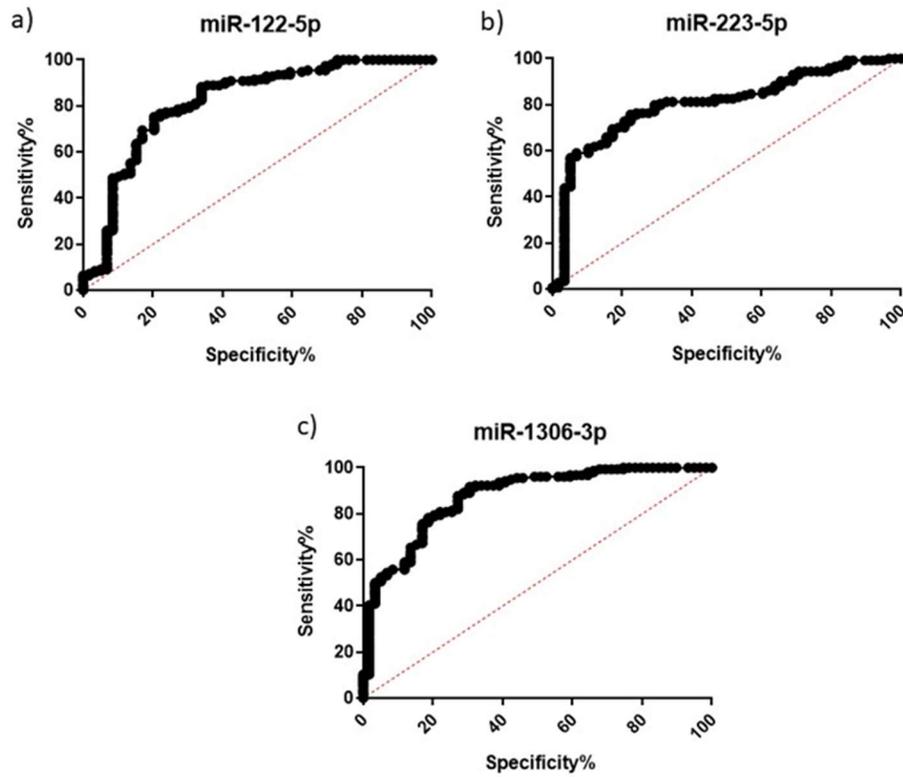


Figura 42. Curva ROC de los miARNs miR-122-5p, miR-223-5p y miR-1306-3p en la evaluación de la función diagnóstico utilizando como normalizador el miR-191-5p con las muestras de EIA correspondientes al tiempo 0.

En la figura 43 se muestran las curvas ROC utilizando como normalizador la media geométrica de los miARNs miR-191-5p y Cel-miR-39.

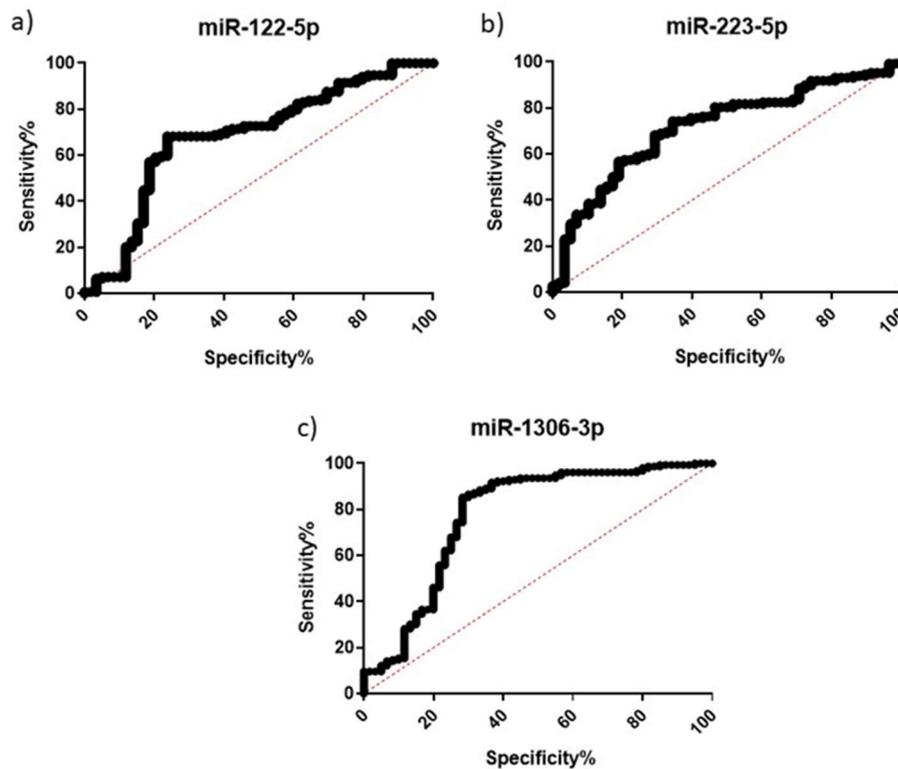


Figura 43. Curva ROC de los miARNs miR-122-5p, miR-223-5p y miR-1306-3p en la evaluación de la función diagnóstico utilizando como normalizador la media geométrica del miR-191-5p y Cel-miR-39 con las muestras de EIA correspondientes al tiempo 0.

En segundo lugar, se evaluó la función diagnóstica de estos miARNs con las muestras EIA correspondientes al tiempo 1, 6 meses tras la entrada en el estudio. En este caso, también se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos al evaluar los tres miARNs (figura 44), obteniéndose valores de AUC, sensibilidad y especificidad más bajos que en el tiempo 0 (tabla 86). Las curvas ROC obtenidas para estos miARNs se muestran en la figura 45.

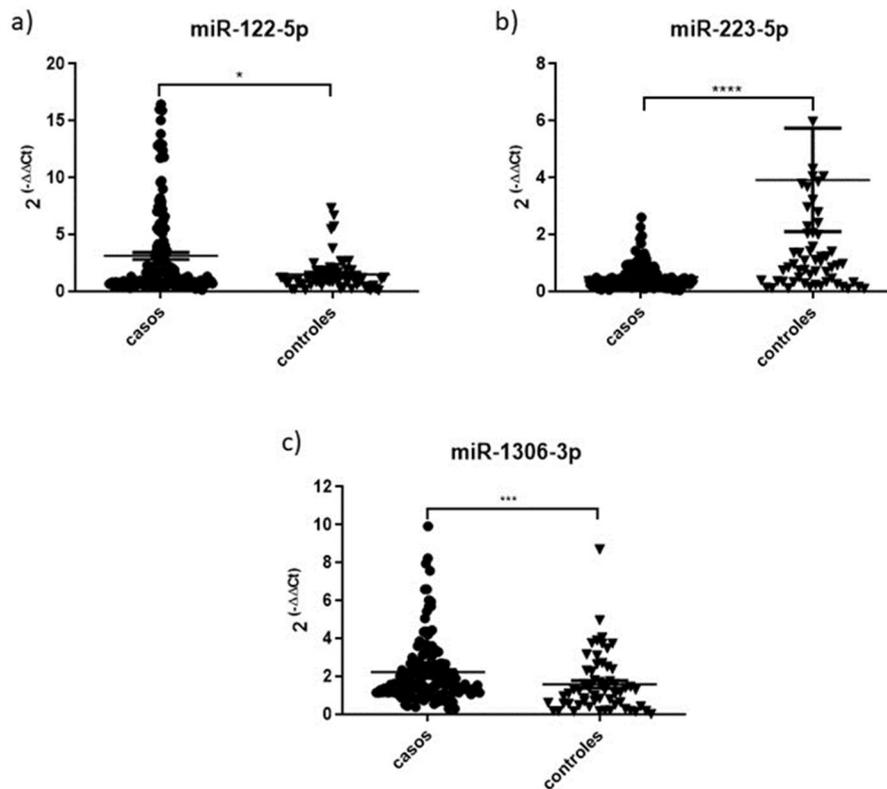


Figura 44. Expresión relativa de a) miR-122-5p, b) miR-223-5p, c) miR-1306-3p en plasma en grupo pacientes (n= 52), correspondientes al tiempo 1, y grupo control (n= 20) utilizando como normalizador miR-191-5p. Se aplicó test de Mann-Whitney. *p valor < 0.05, ***p valor < 0.001, ****p valor < 0.0001.

Tabla 86. Análisis estadístico de la función diagnóstica de las muestras correspondientes al tiempo 1 utilizando el miR-191-5p como normalizador.

miARN interés	miARN referencia	AUC IC 95%	P valor	Valor de Cut off	Sensibilidad	Especificidad
miR-122-5p	miR-191-5p	0.5881 (0.5066-0.6695)	<0.05	1.12	51.61	57.63
miR-223-5p	miR-191-5p	0.7081 (0.6173-0.7988)	<0.0001	0.73	60.34	79.35
miR-1306-3p	miR-191-5p	0.6516 (0.5613-0.7419)	<0.001	1.38	63.82	57.63

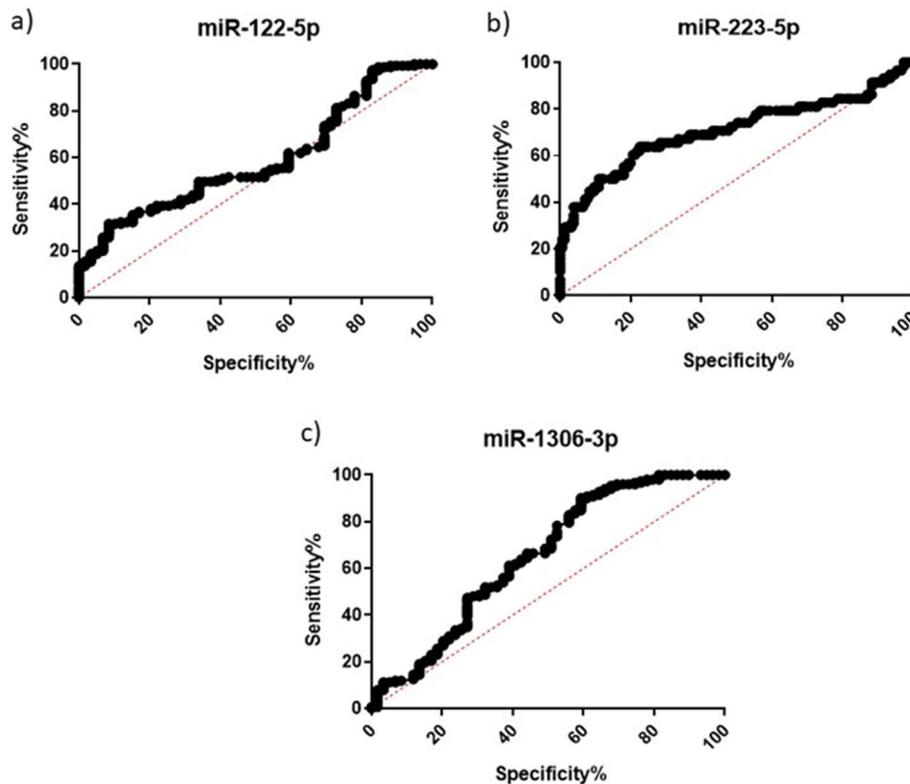


Figura 45. Curva ROC de los miARNs miR-122-5p, miR-223-5p y miR-1306-3p en la evaluación de la función diagnóstico utilizando como normalizador el miR-191-5p con las muestras de EIA correspondientes al tiempo 1.

Finalmente, se evaluó la función diagnóstica del kit ScoliPro® con las muestras de pacientes correspondientes al tiempo 2, 12 meses después de la entrada en el estudio. Al igual que en el tiempo 0 y 1, se observaron diferencias estadísticamente significativas al evaluar los miARNs miR-122-5p (figura 46a) y miR-1306-3p (figura 46b) con mayor expresión de estos miARNs en el grupo casos que en el grupo control. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos cuando se evaluó el miR-223-5p (figura 46c).

En la tabla 87 se indican los valores de AUC así como la sensibilidad y especificidad obtenidos. Los resultados mostraron para el caso del miR-122-5p, un valor de AUC menor que en t0. La sensibilidad fue mayor en t2 que en t0, sin embargo, la especificidad fue más alta en t0. Por lo que respecta al miR-1306-3p, estas tres variables estadísticas fueron similares a las obtenidas en el tiempo 0, aunque en este tiempo los resultados fueron más cercanos a los óptimos. La figura 47 recopila las curvas ROC obtenidas para estos dos miARNs.

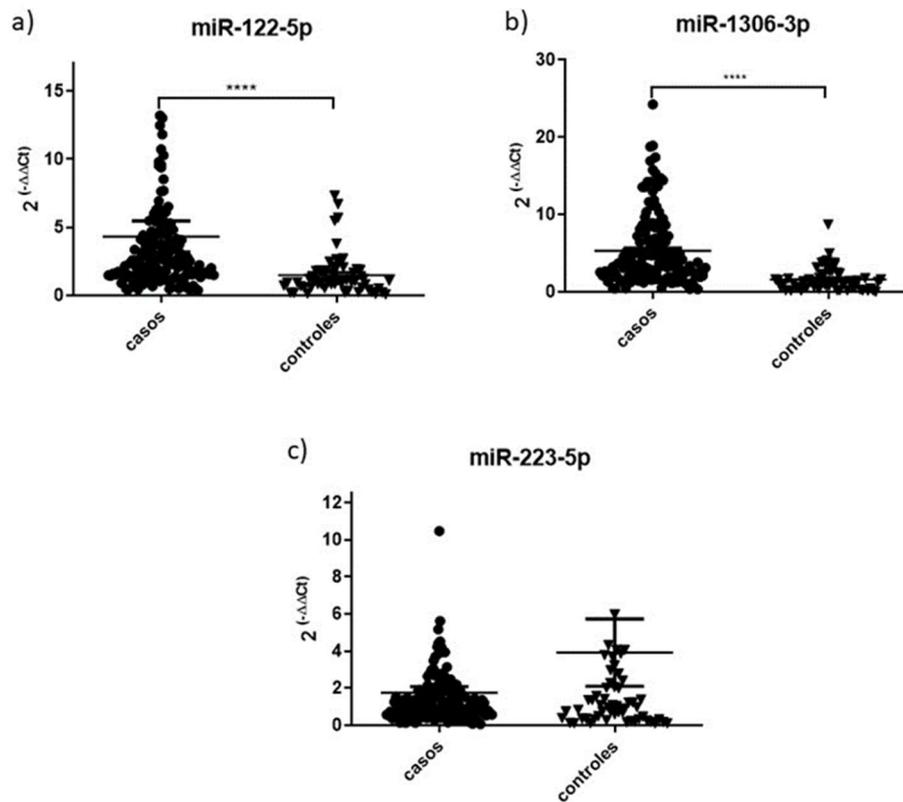


Figura 46. Expresión relativa de a) miR-122-5p, b) miR-1306-3p, c) miR-223-5p en plasma en grupo pacientes (n= 52), correspondientes al tiempo 2, y grupo control (n= 20) utilizando como normalizador miR-191-5p. Se aplicó test de Mann-Whitney. ****p valor < 0.0001.

Tabla 87. Análisis estadístico de la función diagnóstica de las muestras correspondientes al tiempo 2 utilizando el miR-191-5p como normalizador.

miARN interés	miARN referencia	AUC IC 95%	P valor	Valor de Cut off	Sensibilidad	Especificidad
miR-122-5p	miR-191-5p	0.7650 (0.6917-0.8383)	<0.0001	1.24	84.52	66.10
miR-1306-3p	miR-191-5p	0.8293 (0.7692-0.8894)	<0.0001	1.77	82.24	71.19

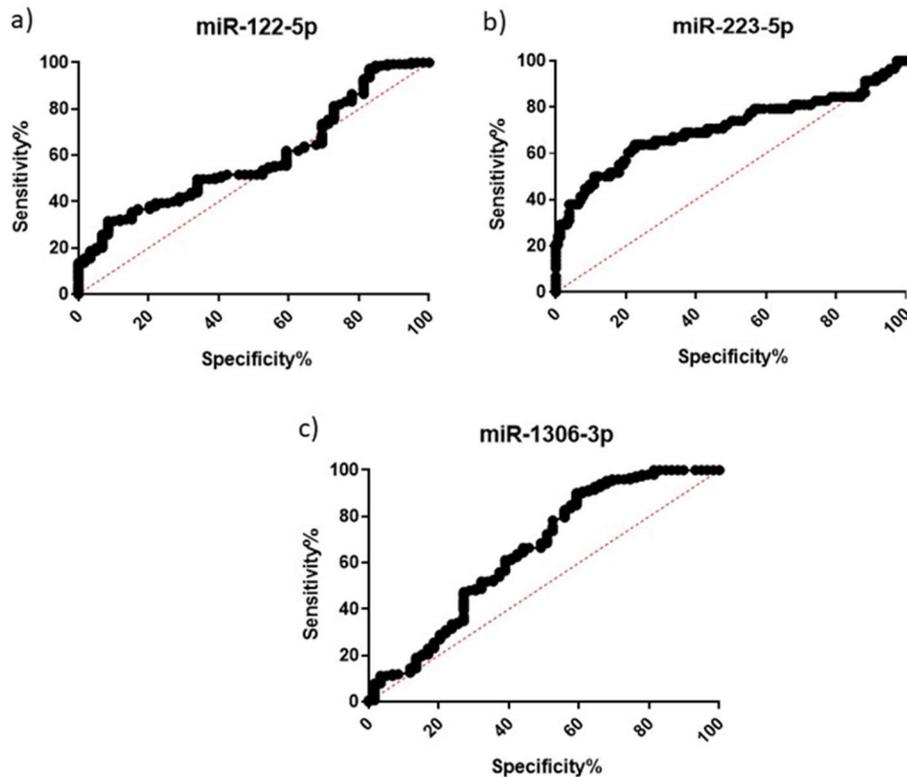


Figura 47. Curva ROC de los miARNs miR-122-5p y miR-1306-3p en la evaluación de la función diagnóstico utilizando como normalizador el miR-191-5p con las muestras de EIA correspondientes al tiempo 2.

4.9.2. Función pronóstica

En este caso se compararon dos grupos de pacientes EIA, aquellos que no progresaban a un ángulo de Cobb mayor a 6° durante un año, identificándose un total de 12 pacientes, con aquellos pacientes EIA clasificados como progresivos. Dentro de este grupo se incluían aquellos pacientes que durante un año evolucionaron a ángulos de Cobb mayores a 6° y aquellos cuyo ángulo de Cobb en la entrada del estudio fue igual o superior a 40° , identificándose un total de 28 pacientes progresivos. En primer lugar, se evaluó esta función pronóstica con las muestras EIA correspondientes al tiempo 0. Los resultados obtenidos para el miR-122-5p indicaron que no existían diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos estudio (figura 48a), observándose una menor variación de los resultados dentro del grupo de pacientes que no progresaban.

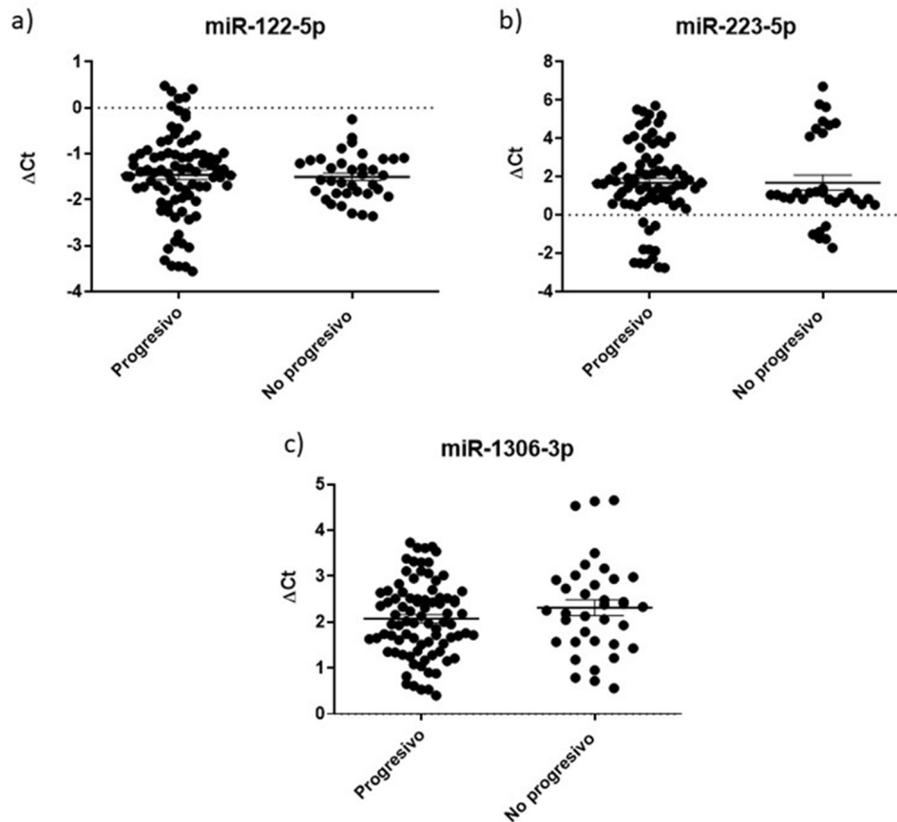


Figura 48. Expresión relativa de a) miR-122-5p, b) miR-223-5p y c) miR-1306-3p en pacientes EIA progresivos (n= 28) y pacientes EIA no progresivos (n= 12) correspondientes al tiempo 0 del estudio.

En el análisis de expresión de los miARNs miR-223-5p y miR-1306-3p tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. Los resultados se presentan en la figura 48b y 48c respectivamente.

En segundo lugar, se estudió la función pronóstica con las muestras EIA correspondientes al tiempo 1 del estudio. En este caso, al igual que en el tiempo 0 cuando se evaluó el miR-122-5p y el miR-223-5p no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (figura 49a y 49b respectivamente). Sin embargo, sí se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas cuando se estudió el miR-1306-3p (figura 49c). Se obtuvo para este miARN un AUC de 0.5404, un valor de *cut off* de 3.46 y una sensibilidad y especificidad de 62.86% y 56.79% respectivamente. La curva ROC se muestra en la figura 50a.

Finalmente, se determinó la función pronóstica con las muestras EIA correspondientes al tiempo 2. El comportamiento que se observó fue similar al del tiempo 1. No observándose diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos al evaluar el miR-122-5p y el miR-223-5p (figura 51a y b, respectivamente), pero sí al estudiar el miR-1306-3p (figura 51c). Para este miARN se obtuvo un AUC de 0.6410, un valor de *cut off* de 2.43 y una sensibilidad y especificidad de 63.10% y 68.57% respectivamente. La curva ROC se muestra en la figura 50b.

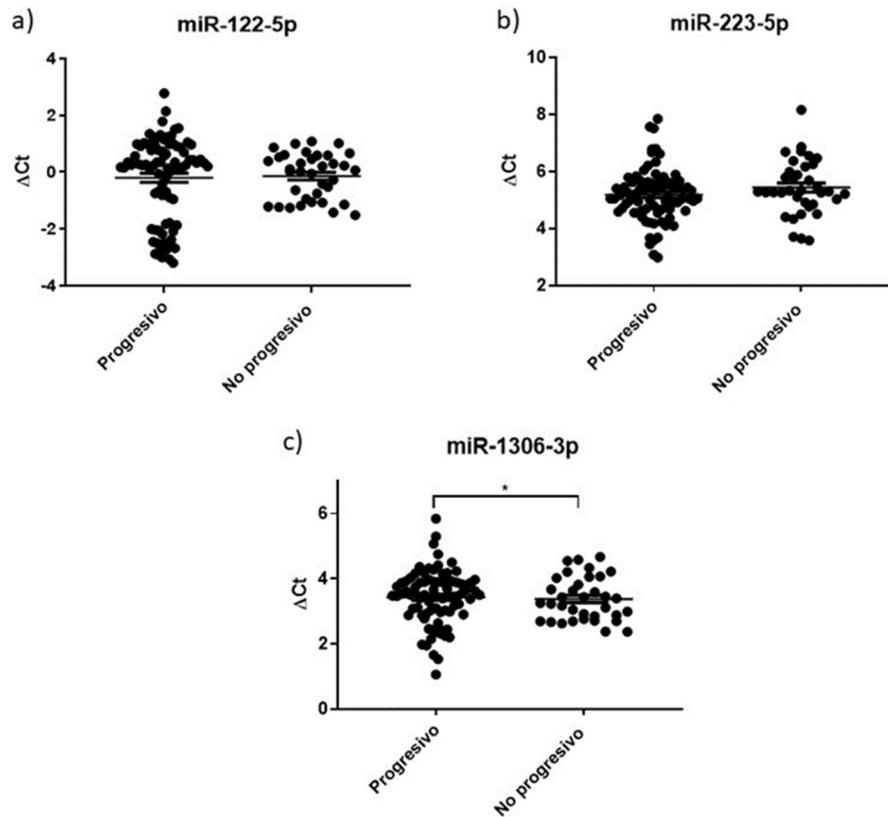


Figura 49. Expresión relativa de a) miR-122-5p, b) miR-223-5p y c) miR-1306-3p en pacientes EIA progresivos (n= 28) y pacientes EIA no progresivos (n= 12) correspondientes al tiempo 1 del estudio. Se aplicó el test de Mann-Whitney. * p valor < 0.05.

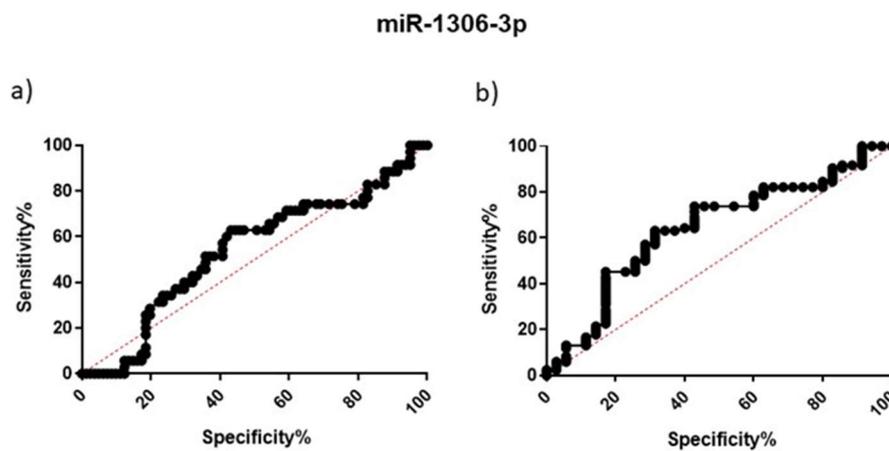


Figura 50. Curva ROC de miR-1306-3p en la evaluación de la función pronóstico utilizando como normalizador el miR-191-5p con las muestras de EIA correspondientes a) tiempo 1 y b) tiempo 2.

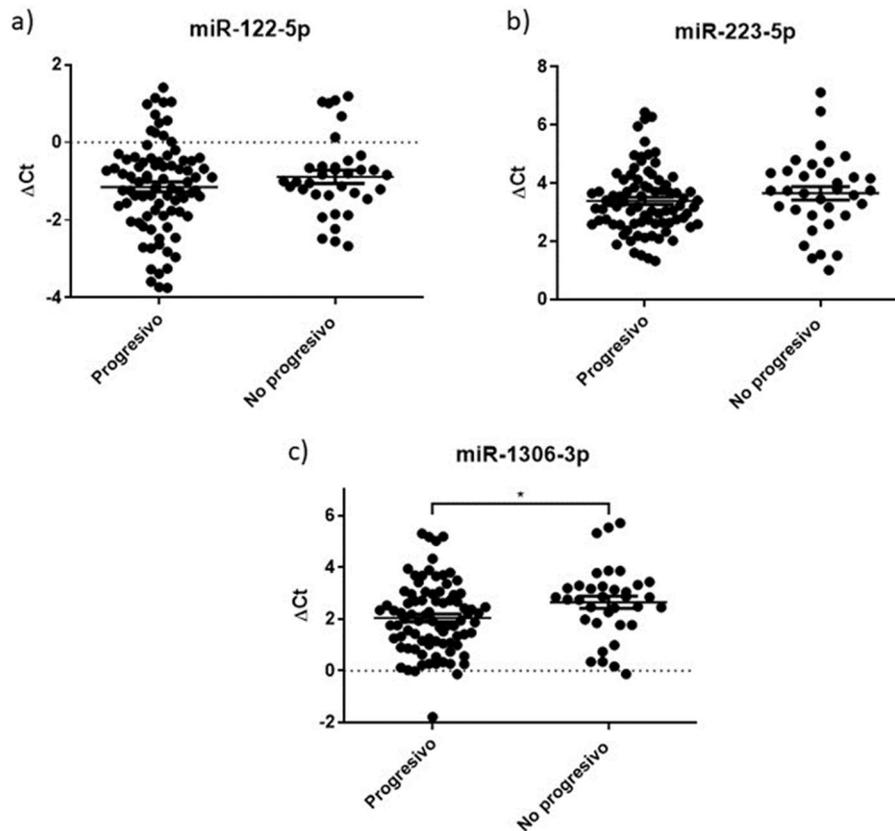
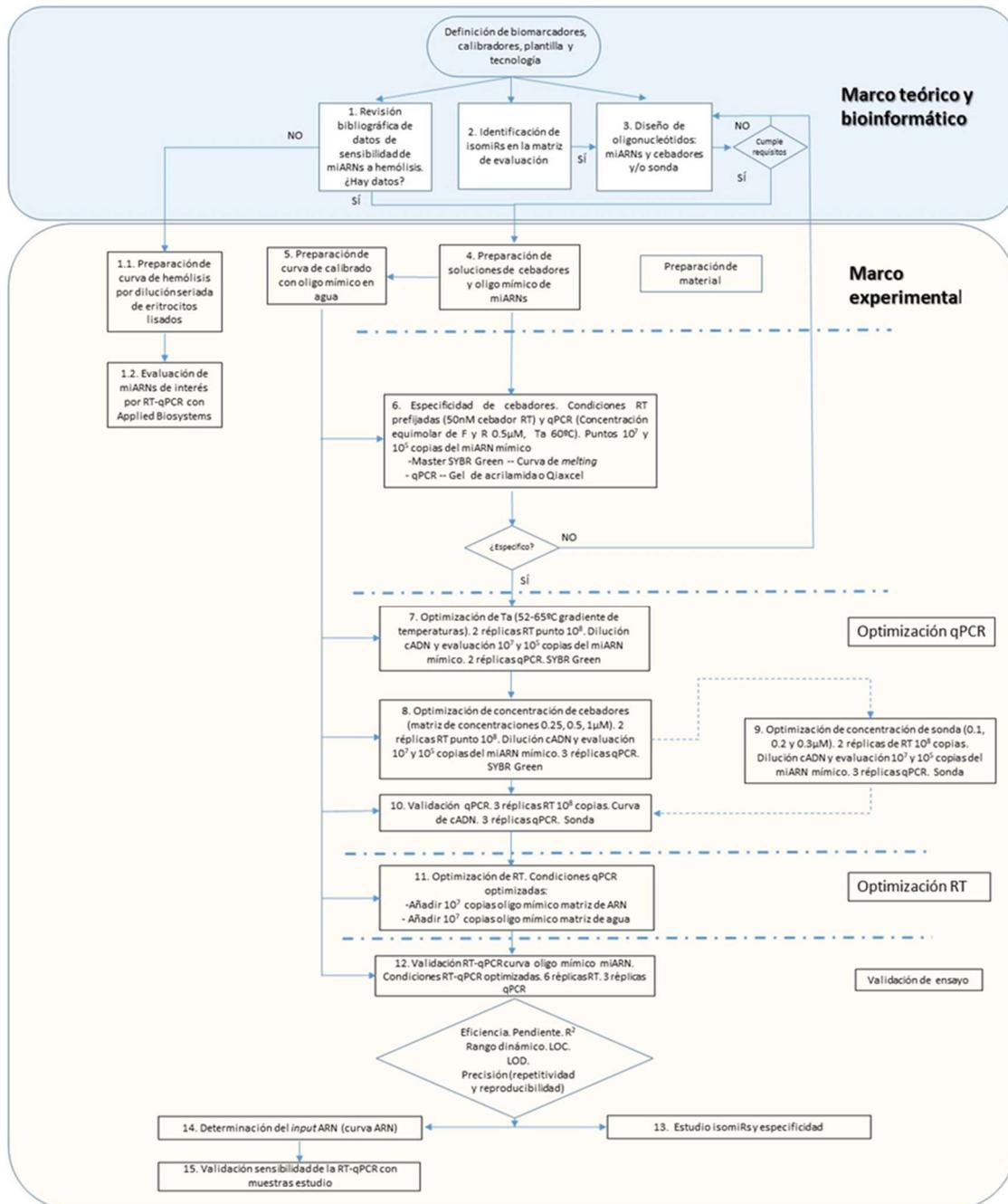


Figura 51. Expresión relativa de a) miR-122-5p, b) miR-223-5p y c) miR-1306-3p en pacientes EIA progresivos (n= 28) y pacientes EIA no progresivos (n= 12) correspondientes al tiempo 2 del estudio. Se aplicó el test de Mann-Whitney. * p valor < 0.05.

4.10. Flujograma para el diseño y optimización de RT-qPCR para la cuantificación miARNs

Con la información y experiencia obtenida de la puesta a punto de la RT-qPCR descrita, se ha propuesto un flujograma que describe el proceso de diseño, y optimización de la RT-qPCR para la cuantificación de miARNs (figura 52). Esta sistemática para cuantificar por RT-qPCR la firma de miARNs biomarcadores de diagnóstico/pronóstico de la EIA en la plataforma LightCycler 480II (Roche *Life Science*), incluye los puntos de control y criterios de validez que se han ido describiendo a lo largo del texto y que, que son aplicables también a otros estudios de miARNs.

Figura 52. Flujograma con los pasos a seguir para la optimización de una RT-qPCR.



En concreto, y en referencia a la figura 52, se ha propuesto la siguiente lista de verificación a tener en cuenta en un proceso de optimización de RT-qPCR:

Elección del método

- Ensayo comercial o ensayo *in-house*
- Elección gen/ miARN diana (*target*)
- Elección del método de detección
- Elección de los oligonucleótidos:

- Diseño de cebadores y sonda basados en (Chen *et al.*, 2005) y (Kramer, 2011)
- Evitar la formación de dímeros de cebadores

Elección del tipo de muestra y el procesamiento

Estrategia de cuantificación

- Curva estándar (cuantificación absoluta)
- Método comparativo
 - Normalización

Verificación de la amplificación del *target*

- Análisis de curva *melting*
- Gel de electroforesis o Qiaxcel
- Secuenciación del amplicón + alineamiento de secuencia (BLAST, *Basic Local Alignment Search Tool*)

Optimización de las condiciones de reacción

- Optimización de la T_a
- Optimización de la concentración de cebadores y sonda
- Optimización de la cantidad de ARN *input*

Características de la qPCR

- Pendiente m : $C_t = \log \text{conc.} \times m + y\text{-intercepto}$
- Eficiencia $E = 10^{-1/\text{slope}}$
- R^2

Verificación analítica (RT- qPCR)

- Linealidad, rango dinámico lineal
- LOD y LOC
- Precisión (repetitividad y reproducibilidad)
- Especificidad analítica

Control de calidad interno

- Control negativo

Seguimiento estadístico o control positivo

5. DISCUSSION

La EIA es una enfermedad que consiste en una curvatura de la columna superior a 10 grados (ángulo de Cobb) con evidencia de rotación vertebral. La causa de la enfermedad puede ser neuromuscular, congénita, infecciosa, etc. (Kim, Blanco and Widmann, 2009). Sin embargo, el 80% de los casos se diagnostican como idiopáticos. La prevalencia mundial de la EIA está entre el 0.5 y el 5.2%, pero se acepta comúnmente que afecta al 3% de la población mundial, es decir, a un total de más de 36.000.000 de pacientes. En el caso de España la prevalencia es del 2% afectando a unos 70.000 pacientes (M. R. Konieczny, Senyurt and Krauspe, 2013)(Fadzan and Bettany-Saltikov, 2017). La técnica rutinaria utilizada en la práctica clínica para el diagnóstico y seguimiento de la EIA es la técnica de rayos X. Sin embargo, esta técnica no tiene valor pronóstico y las repetidas exposiciones han demostrado incrementar la incidencia de cáncer (Morin Doody *et al.*, 2000)(Ronckers *et al.*, 2010)(A Simony *et al.*, 2016). Por ello, es necesario una herramienta basada en biomarcadores que de forma precisa y poco invasiva para el paciente permita establecer un diagnóstico temprano, monitorizar al paciente y predecir el riesgo de progresión. Aunque el papel de los factores genéticos está bien documentado (Fadzan and Bettany-Saltikov, 2017)(Grauers *et al.*, 2013)(Tang *et al.*, 2012), más recientemente, se ha hecho hincapié en el papel de la epigenética, la cual también puede contribuir a la etiopatogenia de la EIA (Geoffrey Burwell *et al.*, 2011)(Meng *et al.*, 2018)(Zhang *et al.*, 2018). De hecho, tras la identificación de la firma de miARNs biomarcadores de la enfermedad miR-27a-5p, miR-122-5p, miR-223-5p y miR-1306-3p (J. García-Giménez *et al.*, 2018), miARNs implicados en rutas moleculares del metabolismo óseo, y posterior patente, se planteó el objetivo principal de la tesis: la implementación de esta firma en un kit IVD, Scolipro[®], basado en la técnica de RT-qPCR en la plataforma LightCycler 480II (Roche). Esto permitiría abordar mejor el manejo clínico de la enfermedad, reducir el coste sanitario y, en definitiva, proporcionar una herramienta que solucione el problema actual. La evaluación clínica del rendimiento del ensayo permitirá preparar un expediente técnico ante el cuerpo notificado sobre producto sanitario de diagnóstico *in vitro* (IVDR 2017/746). En esta misma línea, recientemente Zhang y colaboradores desarrollan una ecuación de regresión logística, un modelo, para predecir el riesgo de progresión de la EIA en el que se integran variables clínicas y biomarcadores moleculares (Zhang *et al.*, 2020b). Entre las primeras se incluyen el ángulo de Cobb de la curva principal, menarquia, peso y Risser. Por lo que respecta a los marcadores moleculares se incluye la expresión del miR-145 el cual se ha visto que está relacionado con la estructura y función anormal de los osteocitos en los pacientes con EIA (Zhang *et al.*, 2018). También se mide en suero P1NP (propéptido aminoterminal del procolágeno tipo I) un marcador de recambio óseo. En definitiva, este modelo compuesto por factores de riesgo de la EIA permite predecir aquellos pacientes cuya curva progresará a más de 40°. El trabajo que en esta tesis se desarrolla es una primera aproximación ya que solamente se miden marcadores moleculares. Sin embargo, el paso siguiente es la integración de los valores de expresión de estos miARNs junto con las variables clínicas (ángulo de Cobb, Risser, edad, menarquia, peso), recopiladas en el estudio de funcionamiento, dentro de un algoritmo el objetivo del cual es predecir la progresión de la curvatura en los pacientes con EIA.

La discusión se centra en aquellos aspectos más relevantes extraídos de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral contrastándose con los descritos en la literatura.

5.1. Efecto de la hemólisis sobre los miARNs biomarcadores EIA

Es de vital importancia identificar las variables preanalíticas que pudieran afectar la sensibilidad, reproducibilidad y robustez de los resultados de expresión de los miARNs, por ello se adoptaron decisiones en relación al muestreo para hacerlo lo más uniforme posible (Abdel Nour and Plaffl, 2020). El protocolo de flebotomía (1), tipo de tubo de sangre (2) o diferencias en el procesamiento de las muestras pueden alterar la cuantificación de los miARNs (3) (McDonald et al., 2011)(Glinge *et al.*, 2017a), lo cual a menudo se confunde con la variación biológica (Abdel Nour and Plaffl, 2020)(Cheng *et al.*, 2013)(Tuck *et al.*, 2009). Por ello, en este estudio se identificaron las variables preanalíticas que pueden afectar a las muestras de plasma, y por tanto a la cuantificación de los miARNs. En base a ello se desarrollaron protocolos y un flujo de trabajo desde la recolección de la muestra hasta su conservación.

En primer lugar, por lo que respecta al procesamiento de las muestras, el paso número uno fue determinar el tipo de tubo de recolección que se iba a usar. Para el estudio con miARNs no se recomiendan los tubos con heparina, ya que es un anticoagulante inhibidor de la PCR y no se puede eliminar durante el proceso de purificación (Glinge *et al.*, 2017a)(Boeckel *et al.*, 2013)(Kaudewitz *et al.*, 2013)(Abdel Nour and Plaffl, 2020). Las muestras de sangre se recogieron en tubos EDTA k2 o k3, en las cuales se ha demostrado además mayor recuperación de miARNs (Mussbacher *et al.*, 2020). Puesto que la expresión de algunos miARNs puede verse afectada por la ingesta de alimentos, se recomendó a todos los pacientes participantes en el estudio acudir al hospital en ayuno (MacLellan *et al.*, 2014).

En segundo lugar, cabe tener en cuenta el tiempo en el que las muestras deben de ser procesadas y la temperatura de almacenamiento. Todas las muestras de plasma de pacientes incluidos en el estudio fueron procesadas dentro de las 4 horas posteriores a la extracción de la sangre (Tuck *et al.*, 2009) ya que los valores de Ct obtenidos en la qPCR se ven afectados por el tiempo que transcurre desde que se extrae la muestra hasta que es procesada, tanto si se guarda a temperatura ambiente como si se almacena a 4°C (Wu *et al.*, 2016). Para minimizar el efecto de alteraciones físicas y mecánicas sobre la estabilidad de los miARNs, los tubos de sangre-EDTA, menos sensibles al efecto de agitación que la fracción plasmática, se transportaron desde los respectivos hospitales hasta el Biobanco CIBRER donde fueron procesadas y almacenadas a -80°C (Glinge *et al.*, 2017a).

En tercer lugar, ya en el proceso de separación del plasma, se ha demostrado que la presencia de partículas de tamaño relativamente grande, como plaquetas y restos celulares (“*debris*”) derivados de las células sanguíneas, afecta a los niveles de algunos miARN circulantes (Shiotsu *et al.*, 2018)(Cheng *et al.*, 2013)(Willeit *et al.*, 2013). Se recomienda, por tanto, la centrifugación a altas revoluciones del plasma para eliminar los efectos de los componentes celulares y posibles sustancias inhibitoras presentes en el plasma, las cuales interfieren con la unión o elución del ARN en la matriz de la columna (Shiotsu *et al.*, 2018)(Meerson and Ploug, 2016). Aunque algunos miARNs como es el caso del miR-122-5p y el miR-223-5p se afectan mínimamente por el procesamiento del plasma, por lo que se sugiere que estos miARNs son independientes de la contaminación por células sanguíneas (Cheng *et al.*, 2013)(Pritchard *et al.*, 2012)(TAmiRNA, 2016)(Kaudewitz *et al.*, 2016), otros en cambio, como es el caso del miR-191-5p, se expresan en

las plaquetas y se liberan cuando estas células se activan (Willeit *et al.*, 2013)(Wakabayashi, Sotoda and Eguchi, 2020)(Maués, Moreira-Nunes and Burbano, 2020)(Bao *et al.*, 2018)(Osman and FÄlker, 2011)(Pan *et al.*, 2014). Por tanto, este paso de centrifugación a altas revoluciones previo a la extracción de miARNs fue incluido dentro del protocolo de procesamiento de las muestras con el objetivo de asegurar que los resultados fuesen fiables.

Todas las condiciones de muestreo descritas tienen relación estrecha con la hemólisis, un factor de gran repercusión en la calidad de las muestras y que puede afectar a la cuantificación de los miARNs. De hecho, los principales factores que se asocian con la hemólisis es la técnica de flebotomía utilizada (el uso de agujas de calibre estrecho, agitación demasiado vigorosa del tubo de sangre) y el protocolo de transporte y separación del plasma (temperatura de transporte de la muestra incorrecta, retraso en la separación suero / plasma de las células y velocidad de centrifugación subóptima y / o tiempo), anteriormente descritos. Por tanto, en esta tesis, también se estudió el efecto de esta variable, realizando en primer lugar una búsqueda bibliográfica de datos de sensibilidad de los miARNs al fenómeno de la hemólisis y, en segundo lugar, llevando a cabo un estudio de hemólisis controlada *in vitro*, a través de curvas de hemólisis (Pizzamiglio *et al.*, 2017)(Shah, Soon and Marsh, 2016)(Kirschner *et al.*, 2011)(Myklebust *et al.*, 2019a) (Kirschner *et al.*, 2013).

En estudios con muestras de suero y plasma se establecen unos criterios de calidad basados en indicadores de hemólisis que han de cumplir las muestras para poder ser incluidas en los estudios (Murray *et al.*, 2015)(Murray *et al.*, 2018)(Mompeón *et al.*, 2020)(Zhelankin *et al.*, 2020) (Kirschner *et al.*, 2013)(Punga *et al.*, 2015)(Panach *et al.*, 2015). Aunque existen varios métodos, en este caso el criterio de inclusión de las muestra de plasma en el estudio de funcionamiento del kit ScoliPro® estuvo basado en el primer indicador de hemólisis estudiado: la absorbancia a 414nm. Se incluyeron todas las muestras cuyo valor de absorbancia fue menor a 0.2 (Kirschner *et al.*, 2011).

Aunque en el experimento de hemólisis controlada *in vitro*, en los dos sujetos control y para un determinado punto de la curva de hemólisis, los valores de absorbancia a 414nm difirieron en algunos casos hasta 0.6 UAF, el comportamiento en ambos controles fue el mismo: aumento de la absorbancia a medida que aumentó el porcentaje de RBCs. Sin embargo, cabe tener en cuenta que, en los puntos más bajos de hemólisis, entre 0% y 0.031%, los valores de absorbancia a 414nm se mantuvieron estáticos. En base al criterio descrito por Kirschner y colaboradores según el cual se consideran hemolíticas aquellas muestras cuya absorbancia es mayor a 0.2 (Kirschner *et al.*, 2011), las muestras de la curva de hemólisis no se consideraron hemolíticas cuando el porcentaje de RBCs fue igual o menor a 0.063% (absorbancia de 0.15 y 0.17, para los sujetos control 1 y 2, respectivamente) (ver tabla 29 apartado 4.1). En otros estudios de hemólisis controlada este punto de corte se establece en porcentaje de RBCs más bajos (Myklebust *et al.*, 2019a)(Kirschner *et al.*, 2011)(Kirschner *et al.*, 2013)(Pizzamiglio *et al.*, 2017)(Shah, Soon and Marsh, 2016).

Por lo que respecta a los indicadores de hemólisis basados en RT-qPCR, se estudió en primer lugar, el cálculo de miR ratio, ΔCt (Ct miR-23a-Ct miR-451a) (Blondal *et al.*, 2013). Los resultados mostraron un aumento en los valores de Ct del miR-451a a medida que se incrementó el grado de hemólisis. Se demostró por tanto experimentalmente que el miR-451a es un miARNs sensible

a la hemólisis (Kirschner *et al.*, 2011)(Pritchard *et al.*, 2012)(Kirschner *et al.*, 2013)(Shah, Soon and Marsh, 2016)(Cheng *et al.*, 2013). Por el contrario la expresión del miR-23a se mantuvo constante (Blondal *et al.*, 2013)(Shah, Soon and Marsh, 2016)(Zhelankin *et al.*, 2020)(Wu *et al.*, 2016), lo cual se reflejó en el aumento de ΔCt a medida que aumentó el % de RBCs. Cuando se aplicó el cálculo de ΔCt en base al criterio descrito originalmente por Blondal *et al.* (Blondal *et al.*, 2013) ($\Delta Ct < 5$ bajo riesgo, ΔCt entre 5-7 riesgo moderado y $\Delta Ct > 7$ riesgo alto de hemólisis) todos los puntos de la curva se consideraron con riesgo severo de hemólisis, incluyendo el punto con 0% de RBCs, ya que el valor obtenido fue superior a 7 (ver tabla 31 apartado 4.1). Sin embargo, cabe tener en cuenta que estos valores de ΔCt se calcularon utilizando en la RT-qPCR la tecnología LNA (Shah, Soon and Marsh, 2016), no siendo esta la tecnología utilizada en el presente estudio. Los resultados obtenidos en esta tesis se ajustaron a los descritos por Zhelankin y colaboradores en el que se utiliza la tecnología Taqman (Zhelankin *et al.*, 2020). Aplicando este criterio (ΔCt 9-11, hemólisis baja), las muestras con bajo grado de hemólisis corresponderían, en ambos sujetos control, a los puntos de la curva con porcentaje de RBCs entre 0% y 0.031% (inclusive), quedando en el límite el punto de 0.063% de hemólisis que superó ligeramente el umbral establecido ($\Delta Ct = 11.4$) (ver tabla 31 apartado 4.1). Estos resultados mostraron que el indicador de hemólisis de miR ratio es más estricto, es un método más sensible en la inclusión de una muestra que la medición de absorbancia (Shah, Soon and Marsh, 2016), ya que el valor de absorbancia a 414nm para este % de hemólisis estaba por debajo de 0.2. Por tanto, si el rango de ΔCt para determinar que el riesgo de hemólisis es bajo se ampliase hasta 11.4, el punto de 0.063% se incluiría y los resultados estarían en concordancia con el indicador espectrofotométrico evaluado hasta el momento (absorbancia a 414nm). De este modo, una muestra se consideraría hemolítica cuando el grado de hemólisis fuese superior a 0.063% de RBCs. Sin embargo, siendo estrictos, en base a los criterios de Zhelankin para miR ratio (Zhelankin *et al.*, 2020) en el cálculo de ΔCt , el punto con 0.063% de RBCs así como el resto de puntos de la curva con % de RBCs superiores se considerarían con riesgo medio de hemólisis ya que el ΔCt estuvo entre 11-14.

Al relacionar estos dos indicadores de hemólisis, se observó una correlación entre el valor de absorbancia a 414nm y el miR ratio (Shah, Soon and Marsh, 2016) (figura 12 apartado 4.1).

Finalmente, previo al cálculo del último indicador de hemólisis, $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, se realizó una primera aproximación en la clasificación de los miARNs en base a los valores de Ct, según el comportamiento en los distintos puntos de la curva de RBCs. En algunos miARNs como es el caso del miR-122-5p los valores de Ct no variaron en los distintos porcentajes de hemólisis (ver figura 10b apartado 4.1) (Pritchard *et al.*, 2012)(McDonald *et al.*, 2011)(Kirschner *et al.*, 2013)(MacLellan *et al.*, 2014)(Meerson and Ploug, 2016)(Panach *et al.*, 2015). Este comportamiento se observó también en el caso del miR-1306-3p y miR-27a-5p (ver figura 10c y 10a apartado 4.1 respectivamente), dos miARNs menos referenciados en la literatura científica ya que no se han propuesto hasta el momento como biomarcadores. Por tanto, en base a este criterio, estos tres miARNs se clasificaron como miARNs no sensibles a la hemólisis. Por lo que respecta al miR-223-5p el comportamiento fue distinto en los dos sujetos evaluados. Mientras que en el control 2 se observó una disminución de los valores de Ct a medida que el porcentaje de RBCs aumentó, en el control 1 se observó una variación en los valores de Ct sin un patrón definido (ver figura 10d apartado 4.1). Por tanto, no se pudo determinar si este miARN era sensible o no a la hemólisis solamente utilizando como criterio los datos crudos de Ct.

Finalmente, respecto a la expresión del miR-191-5p, se observó en el control 2 un aumento proporcional en los valores de Ct a medida que disminuyó el grado de hemólisis. En el caso del sujeto 1, existió una diferencia de más de 2 Cts entre el punto de la curva sin hemólisis y el punto con mayor grado de hemólisis, 0.5%, no observándose esta variación lineal (ver figura 10e apartado 4.1) (Murray *et al.*, 2018)(Myklebust *et al.*, 2019b). En base a estos resultados se podría clasificar este miARN endógeno como ligeramente sensible a hemólisis.

Cuando se calculó el $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ utilizando como normalizador el miR-23a, se confirmaron los resultados obtenidos para el miR-27a-5p, miR-122-5p y miR-1306-3p (ver figura 13a, 13b y 13c apartado 4.1 respectivamente). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los miARNs cuando se compararon entre sí todas las concentraciones de RBCs. En el caso del miR-223-5p los resultados mostraron que los valores de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ fueron similares en todos los puntos de la curva de calibrado, de manera que se concluyó que este miARN no era sensible a hemólisis (ver figura 13d apartado 4.1).

Por lo que respecta al miR-191-5p se observó un aumento de los valores de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ a medida que aumentó el porcentaje RBCs. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el punto sin hemólisis y los puntos con mayor grado de hemólisis, esto es 0.125%, 0.25% y 0.5%. Además, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el punto con 0.031% de RBCs y las muestras con 0.25% y 0.5% de células rojas (ver figura 13e apartado 4.1). Por tanto, este miARN se consideró ligeramente sensible a la hemólisis. Los datos crudos de Ct en el control 2 disminuyeron drásticamente en el punto de 0.125%, al igual que los valores de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (ver figura 10e apartado 4.1). De hecho este comportamiento fue similar a los resultados obtenidos por (Myklebust *et al.*, 2019a), los cuales indican que este miARN es relativamente estable en muestras de suero con escasa hemólisis, 0.05% de células rojas, observándose una disminución en los valores de Ct cuando la concentración de RBCs que se añade a las muestras es de 0.2%. Este comportamiento también se ha demostrado en muestras de plasma con EDTA, en las cuales la variación del miARN es estable con porcentajes bajos de RBCs, 0.016%, produciéndose una variación significativa en la expresión del miARN cuando el porcentaje de células rojas es de 0.125% (Mussbacher *et al.*, 2020).

Al aplicar este indicador de hemólisis, de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, utilizando como normalizador el miR-23a, se obtuvieron resultados robustos, en concordancia con los obtenidos en el resto de los experimentos y con los datos bibliográficos publicados hasta el momento. Además, cabe tener en cuenta que este estudio de hemólisis controlada *in vitro* se realizó solamente con dos sujetos, el estudio con una cohorte mayor permitiría validar los resultados obtenidos y evitar la variabilidad inherente a la muestra observada en las desviaciones estándar en el cálculo de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, es decir, disminuir la variabilidad inter-individuo.

En definitiva, puesto que se comprobó que el miR-191-5p, planteado en el kit como normalizador, era ligeramente sensible a la hemólisis se hizo aún más evidente la importancia de definir y controlar las condiciones de muestreo y manipulación de las muestras desde el primer momento del ensayo de funcionamiento del kit ScoliPro®.

5.2. Estrategia del diseño de la RT-qPCR

5.2.1. Tecnología Taqman y *stem-loop* como metodología para la detección de miARNs

Por lo que respecta a la puesta a punto de la RT-qPCR, se definió en primer lugar el método a utilizar para la detección de miARNs. Se escogió el método descrito por Chen y colaboradores basado en el uso de un cebador de RT en *stem loop* seguido por un análisis con sonda Taqman. El cebador de RT es específico para el miARN de interés, así como la sonda Taqman, la cual es capaz de discriminar entre miARNs que difieren en un solo nucleótido así como entre el miARN maduro y el pre- o pri- miARN (Chen *et al.*, 2005). Este método se utiliza ampliamente para el estudio de miARNs y en concreto para la cuantificación de los miARNs en biofluidos como el plasma o el suero (Murray *et al.*, 2015)(Kroh *et al.*, no date)(Kirschner *et al.*, 2011). Además, está documentado que para estudios de miARNs se obtiene mayor sensibilidad y especificidad cuando se utilizan cebadores en *stem loop* que cebadores de RT lineales (Chen *et al.*, 2005)(Varkonyi-Gasic and Hellens, 2011)(Feng *et al.*, 2009). Por lo que respecta a la sonda, se recomienda el uso de sondas marcadas con FAM cuando se diseñan reacciones *singleplex*, como es este el caso, porque son económicas, fáciles de conseguir, tienen un buen rendimiento y pueden ser detectadas por todos los instrumentos que existen actualmente en el mercado (Bio-Rad, 2006).

Cuando los cebadores son adquiridos directamente de los proveedores, estos no aportan datos experimentales sobre la sensibilidad y especificidad (Bustin *et al.*, 2011). No obstante, los diseños adquiridos en este estudio respetaron que la T_m estuviese entre 50°C y 68°C (Bio-Rad, 2006)(ISO, 2019), el contenido de GC entre un 40% y el 60% (ISO, 2019), que no se favoreciese la formación de estructuras secundarias y que la diferencia entre las temperaturas del par de cebadores fuese de 1°C a 2°C para evitar hibridaciones inespecíficas (Raymaekers *et al.*, 2009). Por su parte la longitud de la sonda fue <30 bases y su temperatura de hibridación fue al menos 5°C más alta que la de los cebadores (Raymaekers *et al.*, 2009)(Abdel Nour and Plaffl, 2020)(LightCycler® 480 Probes Master., 2005) para permitir que la sonda se uniese a la hebra molde antes de que la Taq polimerasa la alcanzase. Dado que la calidad y la exactitud de los datos dependen por completo del comportamiento de los cebadores en cada reacción, los cebadores deben evaluarse *in silico* en lo que respecta a la secuencia, contenido de GC, formación de estructuras secundarias, y afinidad por la secuencia diana como indicadores de especificidad. Además, también deben validarse experimentalmente, durante la optimización de la PCR, en lo relativo a sensibilidad y especificidad, utilizando muestras controles positivas ideales (Taylor *et al.*, 2010)(Mikeska and Dobrovic, 2009)(ISO, 2019). Por ello, se realizó en primer lugar, una optimización analítica de la RT-qPCR con oligonucleótidos de ARN sintético que reproducen las secuencias de los miARNs de interés (mímicos) y posteriormente se probó con muestras reales de plasma.

En el proceso de optimización de una RT-qPCR, uno de los pasos más críticos es el diseño de las secuencias de cebadores y sonda (Raymaekers *et al.*, 2009). Y más aún en el caso de miARNs dada la naturaleza de este amplicón. El diseño de cebadores para la detección de miARNs por RT-qPCR ha supuesto todo un desafío ya que la longitud promedio de estos pequeños ARNs es de tan solo 22 nucleótidos, que es la misma longitud que un cebador de PCR tradicional. Sin embargo, se han desarrollado varios métodos para superar este problema. Todos estos métodos

se basan en el alargamiento del miARN para producir una plantilla lo suficientemente larga como para permitir el diseño de dos cebadores. El método de la RT-qPCR con un cebador RT *stem-loop* y una sonda específica permite la amplificación con dos cebadores específicos lo que posibilita una alta especificidad y una mayor flexibilidad en el diseño de cebadores. El diseño de cebadores y sonda se realizó por la compañía alemana de TIB MOLBIOL (Roche, 2009) por ser la recomendada por Roche y ser referida en varias publicaciones como la de elección para el diseño y síntesis de los cebadores y las sondas para la detección de miARNs (MacLellan *et al.*, 2014)(Hufbauer *et al.*, 2011).

En general en la PCR, aunque no existe un consenso, se suelen utilizar cebadores cuya longitud abarca desde 18 a 24 nucleótidos, ya que cebadores por debajo de 17 nucleótidos pueden reducir la especificidad, mientras que con cebadores más largos (>30 bases) no se mejora en especificidad y además, los cálculos de las T_m son menos fiables (Raymaekers *et al.*, 2009). En este estudio los cebadores utilizados en los diseños definitivos tenían una longitud de 19 a 22 pares de bases, a excepción del cebador *Forward* para el Cel-miR-39 que tenía una longitud de 17 nucleótidos. Cabe tener en cuenta que los principales problemas que aparecen cuando se diseñan cebadores son, por un lado, la formación de estructuras secundarias como *hairpin loops*, por otro lado, el *annealing* de los cebadores entre sí lo que produce lo que se llama comúnmente dímeros de cebadores y finalmente, la dificultad del diseño del par de cebadores que tengan T_m similar y que por tanto, facilite una T_a óptima (Lorenz, 2012).

La T_m de los cebadores se utiliza como indicador de la fuerza de hibridación de los mismos. Normalmente los cebadores se diseñan para que tengan una T_m entre 50 y 68°C (Bio-Rad, 2006) (ISO, 2019). Las guías de PCR indican respecto a las T_m que el diseño de cebadores está basado en el *annealing* y extensión a 60°C, teniendo los cebadores evaluados en este trabajo unas T_m de entre 54.5 y 58.5°C. En todos los diseños evaluados en los distintos miARNs, la diferencia de temperatura entre estos dos cebadores osciló desde 0.1°C en el caso del miR-27a-5p y primer diseño del miR-122-5p, y hasta 3°C en el caso del tercer diseño miR-223-5p (ver apartado 3.1.2).

Por otro lado, por lo que respecta a la sonda, la hibridación de la misma con la molécula diana se estabiliza cuando se utiliza una sonda con una T_m más alta que la hibridación del cebador y *target*, y mayor que la T_a utilizada en la PCR. Por tanto, para asegurar una fuerte unión de la sonda con la molécula diana durante la fase de reconocimiento, esta tiene que tener una T_m que sea de 5-10°C mayor a la de los cebadores, como ya se ha comentado anteriormente (Raymaekers *et al.*, 2009)(Abdel Nour and Plaffl, 2020)(LightCycler® 480 Probes Master., 2005). Es por ello, que se diseñan las sondas normalmente con una T_m entre 60 y 70°C (ver apartado 3.1.2), lo cual concuerda con los diseños de sondas cuya T_m osciló entre 60.7°C hasta 65.8°C (Bio-Rad, 2006)(ISO, 2019).

En este trabajo fueron necesarios varios diseños tanto de cebadores como de sonda. Un ejemplo es el caso del miR-122-5p en el que se probaron dos diseños distintos, ya que con el primero de ellos no se alcanzaron niveles de sensibilidad analítica suficientes para la cuantificación de los miARNs en las muestras de plasma. Lo mismo ocurrió con el miR-27a-5p, en el cual, en el diseño 1, aunque no se presentaron problemas de especificidad, la sensibilidad analítica tampoco alcanzó los niveles necesarios para la cuantificación posterior de dichos miARNs en muestras de plasma. Aunque este miARN no se incluirá en la primera versión del kit ScoliPro® (tiene menor peso en el algoritmo de diagnóstico incluido en la patente) actualmente se está trabajando en

nuevos diseños para este miARN para futuras versiones. Incluso en el caso del miR-223-5p fueron necesarios hasta 3 diseños distintos lo cual evidencia la complejidad de esta tarea (ver apartado 4.2.1). Tanto en este miARN como en el miR-122-5p una de las variables introducidas para mejorar el diseño fue, entre otras, un *stem-loop* más largo. Finalmente, en el caso del miR-1306-3p tanto en el caso del primer diseño como en el del segundo, y definitivo, los problemas encontrados fueron relacionados con especificidad.

5.2.2. Método de cuantificación

Una vez seleccionado el método de detección, se seleccionó el método de cuantificación. En este caso se utilizó el método de cuantificación relativa ya que considera los errores debidos a la recuperación del ARN en la extracción, variación del ARN *input* y la calidad de la muestra, así como la eficiencia de la RT entre las distintas muestras (Varkonyi-Gasic and Hellens, 2011)(Roche, 2009). La determinación y cuantificación exacta de los miARNs se ve obstaculizada por los bajos rendimientos de extracción de ARN en suero o plasma, lo cual complica las estrategias de normalización basadas en la cuantificación del ARN total (Kirschner *et al.*, 2011).

Es importante considerar que una de las principales limitaciones para la aplicación consistente y fiable del uso de los miARNs como biomarcadores es la falta de un sistema estandarizado de normalización. Además, cabe tener en cuenta que no se ha identificado ningún miARN calibrador universal en biofluidos (Chorley *et al.*, 2021). Algunos artículos optan por una normalización global utilizando el promedio de varios normalizadores (Meerson and Ploug, 2016)(Forero *et al.*, 2019)(Poel *et al.*, 2018), otros hacen hincapié en la importancia de utilizar normalizadores externos (*spike-ins*) para considerar el efecto del proceso de extracción del ARN sobre todo en biofluidos en los que el contenido de miARNs es bajo (Shiotsu *et al.*, 2018)(Forero *et al.*, 2019)(Kirschner *et al.*, 2013)(McDonald *et al.*, 2011)(Moldovan *et al.*, 2014)(Marabita *et al.*, 2016). Sin embargo, en otros casos para corregir las variaciones en la composición de la muestra introducida durante la extracción del ARN, la manipulación y el almacenamiento del ARN se opta por utilizar miARN endógeno (Varkonyi-Gasic and Hellens, 2011). De hecho, se recomienda que en los estudios en los que se evalúan pocos miARNs, como es este el caso, se pueden utilizar como controles uno o más miARNs endógenos (Abdel Nour and Plaffl, 2020). Las características que debe de cumplir un buen normalizador son: expresión similar a los miARNs de interés, expresión constante en todas las muestras (no varíe con las condiciones experimentales) y tamaño similar a los miARNs que se han propuesto como candidatos a biomarcadores (estabilidad similar, eficiencia de la extracción y cuantificación)(Abdel Nour and Plaffl, 2020). Además, es fundamental determinar si el tratamiento o la intervención del estudio afecta al nivel de expresión de este control endógeno (applied biosystem, 2008). Todas estas características las cumple el miR-191-5p. Por ello, se propuso como normalizador, con el cual se realizó todo el proceso de optimización de la RT-qPCR. Este miARN se encuentra presente constitutivamente en plasma y se propone como normalizador en estudios de hemólisis (y hemólisis *in vitro* controladas) con muestras de suero y plasma (MacLellan *et al.*, 2014)(Myklebust *et al.*, 2019a)(Blondal *et al.*, 2013)(Mompeón *et al.*, 2020)(Vönhögen *et al.*, 2020) y además se ha utilizado en el estudio previo de descubrimiento de miARNs biomarcadores de EIA (J. L. García-Giménez *et al.*, 2018).

Por otro lado, es importante tener en cuenta que para la elección del miARN como normalizador se recomienda el uso de herramientas como NormFinder, geNorm o Bestkeeper. En estos algoritmos se evalúa la estabilidad de los miARNs candidatos a normalizadores (Poel *et al.*, 2018)(Marabita *et al.*, 2016). No obstante, la elección también se puede basar en la literatura científica, como es aquí el caso (Abdel Nour and Plaffl, 2020). En definitiva, existen tres estrategias principales de normalización. Por un lado, la normalización utilizando la media geométrica (Vandesompele *et al.*, 2002)(Forero *et al.*, 2019). Por otro lado, utilizando un control exógeno (ej. Cel-miR-39) (Xu *et al.*, 2014)(Shiotsu *et al.*, 2018) y, finalmente, normalización frente a un miARN control interno estable (Bustin *et al.*, 2009).

Por ello, en la evaluación de la función diagnóstico del kit ScoliPro® se aplicó la estrategia de utilizar la media geométrica del miR-191-5p y Cel-miR-39 y utilizar un control endógeno como normalizador, miR-191-5p con el objetivo de ver con cuál de ellas se obtenían mejores resultados y así poderse aplicarse al resto de análisis. De hecho, la estrategia de normalización que se recomienda utilizar cuando existen datos experimentales previos, como es aquí el caso, es el uso de un control endógeno como normalizador comprobando previamente que la expresión del *spike-in* no varía en las distintas muestras. Cuando no se da este escenario se siguen otro tipo de estrategias (Chorley *et al.*, 2021). Además cabe tener en cuenta que, el miR-191-5p fue identificado como uno de los miARNs más estables (Forero *et al.*, 2019). Y, en algunos estudios se identifica como el mejor miARN de referencia (Vönhögen *et al.*, 2020)(Myklebust *et al.*, 2019a).

Sin embargo, es importante destacar que en algunos casos se utiliza como normalizador pequeños ARNs no codificantes como RNU6A y RNU6B. Sin embargo, estos ARNs no son miARNs por lo que no reflejan el carácter bioquímico de los miARNs en cuanto a transcripción, procesamiento y patrones de expresión específicos de los tejidos. Además, la eficiencia del proceso de extracción, de la RT y de la amplificación por PCR puede diferir de la de los miARNs (Schwarzenbach *et al.*, 2015). De hecho, algunos autores recomiendan que es mejor normalizar los miARN con genes de referencia que pertenezcan a la misma clase de ARN, es decir, los propios miARNs. Ya que se ha demostrado en algunos casos que el uso de pequeños ARNs nucleares (snRNA) como genes de referencia puede introducir un sesgo al cuantificar la expresión de miARN en algunas enfermedades como el cáncer (Gee *et al.*, 2011). Además, se ha descrito que para los estudios de miARNs en suero, U6 no es un control endógeno adecuado ya que al localizarse en el núcleo no debería estar presente en niveles elevados y constantes en los componentes no celulares de la sangre (MacLellan *et al.*, 2014), utilizándose normalmente como se ha apuntado, para el estudio de miARNs de tejidos y células.

5.3. Optimización de la RT-qPCR en la plataforma LightCycler 480II (Roche)

Se describen en este apartado cada una de las etapas de optimización de la RT-qPCR con los diseños de cebadores definitivos. Aunque el método de cuantificación seleccionado está basado en el uso de la tecnología Taqman, todo el proceso de optimización de la qPCR hasta llegar a la adecuada concentración de sonda se realizó con SYBR Green. El proceso de optimización de la RT-qPCR se realizó en dos etapas. El proceso se inició por la fase de qPCR. Por ello, la estrategia

que se siguió fue la retrotranscripción de un punto, 10^8 copias de oligo mimico del miARN de interés, y dilución seriada del cADN obtenido (Bustin *et al.*, 2009)(Bustin *et al.*, 2010)(Taylor *et al.*, 2010). De esta manera, al realizar el estudio con el cADN diluido las diferencias que se pudieran observar serían debidas a la qPCR y no a la RT (applied biosystem, 2008). Se seleccionó para el estudio de optimización las cantidades de oligo mimico de 10^7 y 10^5 , dos cantidades altas en nº de copias para asegurar la cuantificación del miARN. Para ello se prefijó la concentración de cebador de RT en 50nM, concentración en la que fue descrita por primera vez el diseño de cebador de RT en *stem loop* (Chen *et al.*, 2005), así como las concentraciones de F y R en $0.5\mu\text{M}$ (recomendada como punto de partida en el proceso de optimización)(LightCycler® 480 Probes Master., 2005) y la Ta en 60°C , ya que es la temperatura que suele usarse para garantizar la extensión de la molécula diana a partir de los cebadores en las reacciones de RT-qPCR en dos pasos con sonda Taqman (Raymaekers *et al.*, 2009)(Sigma-Aldrich, no date).

5.3.1. Especificidad de cebadores

La primera tarea experimental descrita en el proceso de optimización fue la evaluación de la especificidad de los cebadores (Bustin *et al.*, 2009)(Feng *et al.*, 2009). Para ello fueron evaluadas las curvas de *melting* con SYBR Green y los electroferogramas resultantes del análisis por electroforesis capilar (Varkonyi-Gasic and Hellens, 2011)(Feng *et al.*, 2009)(Bio-Rad, 2006)(Taylor *et al.*, 2010)(Raymaekers *et al.*, 2009)(Roche, 2009)(Abdel Nour and Plaffl, 2020)(Wang and Zhang, 2012)(Schmittgen *et al.*, 2004).

El análisis de la curva de *melting* con SYBR Green, fluorocromo que se intercala en las hebras de doble cadena, permite la detección de todos los productos amplificados, sean específicos o no (Raymaekers *et al.*, 2009). Puesto que se realizaron duplicados en la RT y qPCR, se decidió que si uno de los 4 replicados en la qPCR tenía una Tm distinta, se categorizaba como inválido y se descartaba para el ensayo, utilizándose los replicados restantes (De Ronde *et al.*, 2017).

La amplificación del producto en la reacción de PCR para la evaluación con la electroforesis capilar se realizó con dos master mix distintas, ya que se trataba de un proceso de optimización del que previamente no se tenía ninguna referencia ni resultados previos, por lo que el objetivo era obtener resultados robustos y evitar interpretaciones incorrectas. Para este tipo de ensayos se recomienda utilizar master mix como FirePol (Solis BioDyne), no obstante, puesto que todo el proceso de optimización de la RT-qPCR se iba a realizar con la Probe Master mix de Roche y por tanto era también con la que se iba a llevar a cabo el ensayo de funcionamiento del kit ScoliPro®, se evaluó también la especificidad de los diseños de los cebadores con esta master mix. Los resultados fueron equivalentes con ambas master mix, por lo que para futuros estudios se podrá utilizar indistintamente una u la otra.

En lo que respecta al miR-122-5p, miR-223-5p y miR-191-5p, el producto amplificado resultó ser específico, con un único pico bien definido y con Tm constante en todos los replicados, sin la presencia de productos inespecíficos en el ensayo con SYBR Green. Sin embargo, en la evaluación del gel de electroforesis capilar, aunque el producto específico, en las dos cantidades evaluadas fue del tamaño esperado se observó la formación de productos inespecíficos en el NTC, intrascendentes al tener baja señal (ver apartado 4.2.2). La mayoría de los productos

inespecíficos tenían un tamaño menor al producto diana esperado por lo que se trataría de dímeros de cebadores (Abdel Nour and Plaffl, 2020). La formación de algunos productos inespecíficos de tamaño distinto al producto esperado suele ser un escenario normal en las reacciones de PCR (Japan, 2004)(Sigma-Aldrich, no date), teniendo, en el caso de estudios de miARNs, una T_m similar a la del producto específico debido al pequeño tamaño de los fragmentos (Varkonyi-Gasic and Hellens, 2011). En definitiva, un diseño de cebadores será específico cuando se observe en la amplificación de la molécula diana un único pico correspondiente al producto (con alta T_m) y no se observen dímeros de cebadores en los controles negativos (NTC y BqPCR) (Sigma-Aldrich, no date). En base a estos resultados se pudo concluir que el diseño de estos cebadores fue apto para continuar con el proceso de optimización de la RT-qPCR.

En cambio, los resultados obtenidos con el miR-1306-3p difieren de los descritos para el resto de miARNs. Con 50 nM de cebador de RT, aunque sí que se observó un único pico en la cantidad de oligo mímico mayor, en la cantidad de 10^5 copias se observaron dos picos, uno coincidió con el producto específico y otro tuvo la misma T_m que se observó en los NTCs. La formación de estos productos inespecíficos hace pensar, como se ha apuntado anteriormente, que sean dímeros de cebadores ya que, normalmente, como es aquí el caso, tienen un tamaño menor al producto esperado o también puede ser que sean productos inespecíficos de tamaño menor al producto específico (Abdel Nour and Plaffl, 2020). En el análisis por Qiaxcel, se observó concordancia con estos resultados, de tal manera que se observó un pico con intensidad considerable en el NTC y de tamaño menor al producto esperado. Ante esta situación se redujo la concentración del cebador hasta 25nM ya que, al reducir la concentración de cebador de RT está descrito que se reducen las amplificaciones inespecíficas (Kramer, 2011). Sin embargo, con esta concentración de cebador de RT se apreció en las curvas de *melting*, un único pico tanto en 10^7 como 10^5 copias, pero siguió observándose un producto inespecífico en el NTC, de igual T_m que el que se observaba con 50nM de cebador de RT. En los resultados con Qiaxcel se observó una única banda en 10^7 , pero dos bandas en el caso de 10^5 (más notable con la master mix FirePol). En el NTC, mientras que con la master mix FirePol la intensidad de la banda fue baja, con la Probe master mix el producto formado tuvo una intensidad notable, similar a la obtenida con 10^5 copias de oligo mímico. En definitiva, aunque sí que se redujeron las inespecificidades visibles cuando se estudiaron 10^5 copias, siguieron formándose productos inespecíficos en el NTC. Sin embargo, se ha referido que en las qPCR en las que se utiliza sonda de hidrólisis, como es este caso, no es necesario el estudio de la curva de *melting* dada la especificidad de la sonda en detectar sólo el producto de amplificación correcto (De Ronde *et al.*, 2017). Por ello, se continuó el proceso de optimización de la RT-qPCR con este juego de cebadores y con 50nM de cebador de RT, para estudiar si la inclusión de la sonda del miR-1306-3p era capaz de detectar con sensibilidad-especificidad este miARN en las condiciones consenso elegidas para el resto de miARNs en estudio. Además, esta decisión también fue tomada debido a que se trataba del segundo diseño de cebadores para este miARN, observándose en el primer diseño el mismo problema de especificidad comentado.

Además, es importante destacar que algunas de las recomendaciones para disminuir la formación de dímeros de cebadores es optimizar la T_a y las concentraciones de cebadores, actividades que se llevaron a cabo posteriormente como parte de la optimización de la RT-qPCR (Abdel Nour and Plaffl, 2020)(Mikeska and Dobrovic, 2009).

En definitiva, en general, los resultados obtenidos en el estudio de electroforesis capilar concordaron con las conclusiones de los análisis de curvas de *melting*, independientemente de la master mix utilizada.

Finalmente, cabe tener en cuenta que en el proceso de optimización de la RT-qPCR, no se incluyó la optimización de cebadores y sonda para el Cel-miR-39, aunque sí se comprobó la especificidad mediante estudio de las curvas de *melting*, ya que el fin de este miARN fue servir como control de extracción y normalizador externo donde la sensibilidad no era un objetivo crítico. Por ello, por lo que respecta a este Cel-miR-39, se asumieron las condiciones experimentales determinadas como óptimas para el resto de miARNs.

5.3.2. Optimización de las condiciones de qPCR

5.3.2.1. Optimización de la Ta

Al empezar la optimización por la qPCR, se puede, fijar las concentraciones de cebadores y optimizar la Ta, o al revés. Técnicamente es una aproximación más sencilla fijar la concentración de cebadores y después seleccionar la temperatura óptima con esa combinación de juego de cebadores (Sigma-Aldrich, no date). Además, la optimización de la Ta se considera una fase crítica que debe de llevarse a cabo en los primeros pasos cuando se evalúan nuevos cebadores (Taylor *et al.*, 2010)(Abdel Nour and Plaffl, 2020), de ahí que fuera la segunda tarea experimental llevada a cabo en el proceso de optimización de la RT-qPCR. La importancia de esta variable radica en que además, el apareamiento óptimo de los cebadores con su diana es determinante crítico en la eficiencia de la amplificación (Abdel Nour and Plaffl, 2020)(Bustin *et al.*, 2009). Para realizar esta tarea es necesario el uso de un termociclador que tenga una función de gradiente de temperatura (Sigma-Aldrich, no date)(Taylor *et al.*, 2010)(Bio-Rad, 2006)(Abdel Nour and Plaffl, 2020), como es el equipo de iQ5 Bio-Rad que aquí se utilizó, el cual hace, dentro de un mismo ensayo, un barrido de 8 Ta.

Este análisis se realizó solamente con el miARN endógeno miR-191-5p ya que este miARN será el normalizador en todas las reacciones de cuantificación, y además la Tm de los cebadores de todos los miARNs oscilaban en igual rango, por tanto, la Ta determinada debe ser extrapolable. En concreto, las Tm de F y R oscilaron entre 55.5°C y 58.5°C, situándose la media en 56.4°C (con una desviación estándar de +/- 0.93) por lo que el rango de Ta que se estudiaron estuvieron por encima y por debajo de estas Tm (Bio-Rad, 2006)(Taylor *et al.*, 2010). En concreto la última actualización de la guía MIQE recomienda que el rango de temperaturas ha de comprender +/- 6°C la Tm de los cebadores (Abdel Nour and Plaffl, 2020). En base a este criterio, el rango de temperaturas a estudiar debió de estar entre 50°C-65°C, aproximadamente. El *software* del termociclador proporciona una serie de rangos, el que más se ajustó a estos criterios y se aplicó fue el gradiente desde 52°C hasta 65°C. Finalmente, cabe tener en cuenta que la aproximación que se siguió en este experimento simplificó el proceso técnico ya que, en definitiva, con la configuración del kit se deben de proponer condiciones consenso (todos los miARNs se evalúan en la misma placa y por tanto con una misma Ta).

Los resultados mostraron en las dos cantidades estudiadas, 10^7 y 10^5 copias de oligo mímico, valores de Ct más altos con Ta más altas (ver tabla 32 apartado 4.2.3.1), condiciones más restrictivas, de tal manera que solo los cebadores que aparezcan correctamente con el miARN diana lo harán. Por el contrario, con Ta más bajas, condiciones más laxas, se favorecen uniones no tan específicas disminuyendo los valores de Ct a medida que la Ta disminuía. Este comportamiento se hizo evidente también en el NTC, para los que no detectó amplificación (Ct indeterminadas) con Ta más altas, mientras que con las temperaturas más bajas se obtuvieron valores de Cts altos (ver tabla 32 apartado 4.2.3.1).

Otro criterio que se debe tener en cuenta es la reproducibilidad de los replicados de los Cts. Una de las limitaciones de este experimento fue el uso del bloque para placa de 96 pocillos por lo que el diseño experimental solo permitió la realización de duplicados para cada una de las cantidades de oligo mímico miARN/controles negativos evaluados. No obstante, con los resultados obtenidos se observó una menor variabilidad en los replicados con 10^7 copias que con 10^5 copias, ya que esta última estuvo más cerca del límite de detección en este ensayo (ver tabla 33 apartado 4.2.3.1). Del mismo modo, el hacer duplicados en los NTCs permitió evaluar la presencia o ausencia de dímeros de cebadores (Taylor *et al.*, 2010).

Se determinó como óptima una Ta de 60°C. Con esta Ta, se aseguró de manera eficaz el alineamiento cebadores-miARN, obteniéndose un buen equilibrio sensibilidad, especificidad, reproducibilidad (Taylor *et al.*, 2010)(Abdel Nour and Plaffl, 2020). Cabe señalar que esta Ta se suele utilizar, como se ha apuntado anteriormente, en las reacciones en dos pasos en los que se utiliza sonda Taqman (Sigma-Aldrich, no date) ya que la baja temperatura de elongación promueve el aumento de la actividad exonucleasa de la enzima ADN polimerasa y el desplazamiento de la sonda. Finalmente, esta temperatura y el tiempo de *annealing* de 1 minuto se ha utilizado en estudios de RT-qPCR con sondas Taqman para detectar miARNs (Chen *et al.*, 2005)(Kramer, 2011)(Murray *et al.*, 2018)(Kirschner *et al.*, 2013)(Kirschner *et al.*, 2011)(Glinge *et al.*, 2017a)(Murray *et al.*, 2015)(Le Carré, Lamon and Léger, 2014)(Ramon *et al.*, 2018)(applied biosystem, 2019).

5.3.2.2. Optimización de concentraciones de cebadores F y R

Después de la optimización de la Ta, el paso siguiente es la optimización de la concentración de cebadores F y R aplicando esta Ta. El uso de una matriz de optimización de cebadores se recomienda a menudo en los manuales técnicos para mejorar el rendimiento de los ensayos de RT-qPCR (Mikeska and Dobrovic, 2009)(Sigma-Aldrich, no date). Normalmente para la determinación de la mejor combinación de F y R los estudios se diseñan de tal manera que se evalúe un rango de concentraciones similar al que se ha llevado a cabo en esta tesis. El kit de PCR que se utilizó, LightCycler® Probe Master Mix (Roche), aunque está diseñado para ARNm, recomienda probar el rango de 0.3µM a 1µM (LightCycler® 480 Probes Master., 2005), así como otras guías y estudios proponen evaluar concentraciones de entre 50-900nM y 125-500nM (Express, 2009)(Japan, 2004)(Balcells, Cirera and Busk, 2011)(Ding *et al.*, 2012)(Mei *et al.*, 2012).

Cuando se utilizan cebadores que tienen Tm entre 55-60°C normalmente se suelen utilizar concentraciones equimolares de F y R 0.5µM (Roche, 2009). En este caso, y en base a los

resultados presentados en el apartado 4.2.3.2, estas condiciones equivalen a la condición 5. En concreto, el kit de PCR LightCycler® Probe Master Mix (Roche), recomienda empezar el proceso de optimización con 0.5µM de cada uno de los cebadores (LightCycler® 480 Probes Master., 2005). En otras guías también se recomienda esta misma concentración (Sigma-Aldrich, no date), utilizándose también en varios estudios de miARNs (De Ronde *et al.*, 2017)(Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007)(Varkonyi-Gasic and Hellens, 2011). En este estudio, los resultados concuerdan con estas referencias. En concreto, en el caso de los miARNs miR-122-5p y miR-191-5p no se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los valores de Ct de esta condición 5 respecto a las condiciones en las que se obtuvieron mejores resultados en cuanto a sensibilidad, en las que 1 µM de F se combinó con el resto de las concentraciones de R (condiciones 7-9) (ver figura 20 y 23 apartado 4.2.3.2 respectivamente). De hecho, en estos dos miARNs los valores de Ct promedio para las dos cantidades estudiadas tendieron a disminuir de manera lineal desde la condición 1 a la 9 (ver tabla 35 y 38 apartado 4.2.3.2 para el miR-122-5p y miR-191-5p, respectivamente). Este comportamiento se observó también en el caso de la cantidad de 10⁷ copias en el miR-223-5p (ver tabla 36 apartado 4.2.3.2).

Por lo que respecta a las curvas de *melting*, en el caso del miR-122-5p, se observaron dímeros de cebadores en el NTC en la condición 6 (0.5µM de F y 1µM de R) y en las condiciones 7 a la 9 (se utilizó 1µM de F) (anexo 8). En el caso del miR-223-5p estos productos inespecíficos empezaron a aparecer también en las condiciones 7-9 (anexo 9), al igual que con el miR-191-5p en el que, además, aparecieron también algunas inespecificidades en algunos de los replicados en el NTC en la condición 3 en la que se utilizaron 0.25µM F- 1µM R y condición 6 (0.5µM F-1µM R) (anexo 11). En general parece que las concentraciones altas de F y R, de 1µM, favorecen la formación de estos productos, el cebador está en exceso y podría aparearse consigo mismo o con el F/ R o el cebador de RT (Mikeska and Dobrovic, 2009). En definitiva, cuando aumentan las concentraciones de cebadores los valores de Ct son menores (Abdel Nour and Plaffl, 2020), pero se forman productos inespecíficos.

Por el contrario, cuando se trabaja con concentraciones bajas de cebadores se reduce la formación de productos no-específicos (Sigma-Aldrich, no date). De hecho, en estos 3 miARNs (miR-122-5p, miR-223-5p y miR-191-5p) no apareció ningún producto inespecífico al utilizar concentraciones equimolares de F y R de 0.25 µM, 0.25 µM F-0.5 µM R, 0.5 µM F-0.25 µM R y 0.5 µM F-0.5 µM R.

Los resultados obtenidos con el miARN miR-1306-3p difieren del resto, si bien, al igual que ocurría con el miR-122-5p, los resultados de Ct más bajos se obtuvieron cuando se utilizaron concentraciones equimolares de F y R 1µM y los más altos con las concentraciones de 0.25µM, se observó la formación de productos inespecíficos en el NTC en todas las condiciones estudiadas (anexo 10). En estos controles negativos el pico de la curva de *melting* fue menor en las condiciones en las que se utilizó 0.25 µM de R (condiciones 1, 4 y 7). Por tanto, concentraciones bajas de R redujeron la formación de productos inespecíficos.

En definitiva, en base a los criterios establecidos para la elección de la mejor combinación de cebadores, es decir, menor valor de Ct y menor variación en los replicados manteniéndose la curva sigmoideal, sin la formación de productos inespecíficos en el NTC (Sigma-Aldrich, no date)(Sigma-Aldrich, 2008), se escogió la concentración equimolar de 0.5µM. Los valores de Ct en esta condición no mostraron diferencias estadísticamente significativas con las condiciones

en las que se obtuvieron los valores de Ct más bajos, en las cuales se detectaron a su vez productos inespecíficos, es decir, se confirmó que la sensibilidad mejora en detrimento de la especificidad. Se decidió continuar el proceso de optimización para todos los miARNs con estas concentraciones con el objetivo de unificar las condiciones para todos los miARNs en estudio, aunque como se ha comentado antes en el caso del miR-1306-3p se formaron productos inespecíficos en el NTC en todas las combinaciones estudiadas. En otros estudios de miARNs se usan concentraciones más bajas de los cebadores, en el orden de 0.25 μM (Balcells, Cirera and Busk, 2011)(Mei *et al.*, 2012), concentraciones equimolares y concentraciones más altas, de 0.8 μM y 0.9 μM (Feng *et al.*, 2009)(Schmittgen *et al.*, 2004)(applied biosystem, 2005)(*TaqMan*® *Gene Expression Assays Protocol For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures*, 2010), y propuestas en las que se utiliza el F con el doble de concentración que el R (1.5 μM F-0.7 μM R)(Chen *et al.*, 2005)(Kramer, 2011).

5.3.2.3. Optimización de la concentración de sonda

Una vez definidas las concentraciones de F y R, y puesto que el ensayo final se iba a realizar con sonda Taqman, el paso siguiente fue la optimización de la concentración de sonda. El rango de concentraciones evaluado fue desde 0.1 μM hasta 0.3 μM (Chen *et al.*, 2005)(Express, 2009)(Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007)(Roche, 2009)(applied biosystem, 2005)(*TaqMan*® *Gene Expression Assays Protocol For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures*, 2010)(Glynn, 2014)(LightCycler® 480 Probes Master., 2005)(Japan, 2004).

Los resultados mostraron en todos los miARNs de estudio y en las dos cantidades evaluadas de oligo mímico el mismo comportamiento, la sensibilidad mejoró a medida que disminuyó la concentración de sonda. Aunque solamente se observaron diferencias estadísticamente significativas entre 0.1 μM y 0.3 μM en una de las dos cantidades evaluadas en los miARNs miR-223-5p (ver figura 25 apartado 4.2.3.3) y miR-1306-3p (ver figura 26 apartado 4.2.3.3) y en las dos cantidades en los dos miARNs restantes (miR-122-5p y miR-191-5p) (ver figura 24 y 27 apartado 4.2.3.3 respectivamente), es importante destacar que la diferencia de Ct fue en todos los casos menor a 1. También es importante tener en cuenta que la variación de las concentraciones de los cebadores tuvo un mayor efecto en el rendimiento del ensayo que la concentración de sonda (Mikeska and Dobrovic, 2009).

Otra consideración importante para obtener datos precisos de la qPCR en tiempo real es la calidad de la sonda. Incluso una sonda perfectamente diseñada puede fallar si está mal sintetizada o purificada. Además, una eliminación inadecuada de la sonda, un acoplamiento ineficaz y/o deficiente *quenching* pueden producir un elevado ruido de fondo fluorescente. Una baja relación señal-ruido de fondo da lugar a una disminución de la sensibilidad y a un menor rango dinámico lineal o dicho a la inversa, si se optimiza la concentración de sonda se puede mejorar la relación señal-ruido de fondo (Bio-Rad, 2006)(Mikeska and Dobrovic, 2009).

En este ensayo, en el caso del miR-1306-3p, no se produjeron amplificaciones inespecíficas en el NTC, los valores de Ct obtenidos se reportaron como indeterminados (ver figura 26 apartado 4.2.3.3). Por ello, en base a estos resultados se continuó el proceso de optimización de la RT-qPCR con este diseño de cebadores.

Para determinar la concentración de sonda óptima, un criterio que se tiene en cuenta en algunas guías es la intensidad de fluorescencia, marcada por la pendiente de la curva de amplificación (Japan, 2004). Sin embargo en este caso, solamente se consideró el valor de Ct y la reproducibilidad de los replicados (Sigma-Aldrich, no date), ya que los resultados de sensibilidad apenas variaron en las tres concentraciones evaluadas (valores de Cts muy similares). Además, puesto que el objetivo final era integrar los distintos componentes que forman parte del ensayo dentro de un kit comercial, es importante optimizar las concentraciones de los reactivos y por ello, con la concentración de 0.1 μM el coste de producción del futuro kit sería menor. No obstante, sí se observó un aumento de la intensidad de fluorescencia en todos los miARNs a medida que aumentó la concentración de sonda (los resultados de las curvas de amplificación no se muestran) pero esto no tuvo ningún efecto en los resultados de los datos crudos. En definitiva, se obtuvo la misma sensibilidad y con un menor coste. Sin embargo, otros autores, en estudios de miARNs con sonda Taqman determinaron como concentración óptima concentraciones de sonda mucho más altas, hasta 0.8 μM (Kramer, 2011).

5.3.2.4. Validación de la qPCR

Una vez optimizados todos los parámetros analíticos correspondientes a la parte de la qPCR, se procedió a la validación de la misma, para ello se aplicaron las condiciones ya definidas de Ta, concentración de F y R, así como la concentración de sonda. La forma más efectiva de medir el rendimiento de un ensayo es a través de una curva de calibrado o curva estándar preparada por diluciones seriadas de *template* (Bustin *et al.*, 2009)(Raymaekers *et al.*, 2009)(Roche, 2009)(Bio-Rad, 2006)(Kralik and Ricchi, 2017a)(Taylor *et al.*, 2010). Por ello, se aplicó la misma estrategia descrita hasta el momento: retrotranscripción de una cantidad de oligo mímico y diluciones 1:10 con agua libre de ARNasas del cADN obtenido. Con los resultados derivados de este experimento se evaluó la pendiente de la recta, la eficiencia de PCR y el valor de R².

En este experimento se realizaron 3 reacciones de RT-qPCR, ya que en la evaluación de ensayos de RT-qPCR es crítico usar como mínimo tres replicados técnicos por cada punto (Raymaekers *et al.*, 2009)(Sigma-Aldrich, no date)(Kevin Kelnar *et al.*, 2014)(Taylor *et al.*, 2010).

Por lo que respecta al valor de la pendiente promedio, se observó en todos los miARNs que estuvo entre -3.4 y -3.8 (ver apartado 4.2.3.4). Aunque el valor de pendiente en una curva de calibrado formada por diluciones 1:10 ha de ser -3.32, lo cual significa una eficiencia de la PCR del 100%, se acepta para considerar un buen proceso de amplificación que la pendiente pueda estar entre $-3.6 < m < -3.1$ (Ramon *et al.*, 2018)(Raymaekers *et al.*, 2009)(Abdel Nour and Plaffl, 2020)(Japan, 2004). Sin embargo, en algunos estudios de miARNs el rango de aceptación es mayor, de -3.92 a -2.92 (Coulter, 2012).

La eficiencia viene determinada por el valor de pendiente. Cuando se asume que la eficiencia es del 100% significa que la cantidad de producto se dobla en cada ciclo de PCR. En este caso los valores de eficiencia promedio fueron superiores al 90%, estando en el caso de los miARNs miR-122-5p, miR-223-5p y miR-1306-3p por encima del 95% (ver tabla 39, 40 y 42 apartado 4.2.3.4 respectivamente) lo cual se ajustó al rango entre 90-105% (Bio-Rad, 2006)(Kralik and Ricchi, 2017a). No obstante, en algunos estudios y en las guías de PCR el margen de eficiencia que se

aplica es más laxo abarcando desde eficiencias de 90% hasta 110% (ISO, 2019)(Raymaekers *et al.*, 2009)(Taylor *et al.*, 2010)(Badri *et al.*, 2016)(Abdel Nour and Plaffl, 2020)(Hunter *et al.*, 2017)(Ramon *et al.*, 2018)(Japan, 2004).

Finalmente, el último parámetro analítico que se evaluó fue el valor de R^2 , es decir, una medida de cómo los puntos se ajustan a la recta. En todos los miARNs evaluados este valor se situó entre 0.99 y 0.999 (Raymaekers *et al.*, 2009).

5.3.3. Optimización de la concentración de cebador de RT

Una vez terminada la optimización de la qPCR, se procedió a la optimización de la etapa de RT. Por ello, en este punto cambió la estrategia experimental de manera que el producto de la RT se amplificó directamente en la qPCR, sin la dilución previa del cADN. Esta reacción de RT se realizó con concentraciones de cebador de RT de 50nM, 500nM y 1000nM, concentraciones que suelen utilizarse para estudios de miARNs, incluida la tecnología *stem loop* (Czimmerer *et al.*, 2013)(Chen *et al.*, 2005)(Adachi *et al.*, 2010)(Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007)(Varkonyi-Gasic and Hellens, 2011)(Yi *et al.*, 2013)(Androvic *et al.*, 2017) y que están dentro del rango recomendado en el kit de RT que se utilizó, *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche) (Roche, 2017).

Es importante destacar que la etapa de RT introduce una variación importante en los ensayos de RT-qPCR, por ello se recomienda que los ensayos se realicen por duplicado o triplicado para mejorar la fiabilidad (Bustin *et al.*, 2009)(Bustin *et al.*, 2010). De hecho, en algunas plataformas el paso limitante en cuanto a sensibilidad es el paso de la RT más que la qPCR (Abdel Nour and Plaffl, 2020). En este caso se realizaron duplicados en la RT. En concreto, el oligonucleótido mímico de cada uno de los miARNs se añadió a una matriz de agua y una matriz de ARN de cerebro. Esto permitió determinar si los miARNs se expresaban en esta matriz de cerebro, aportando datos de si podría ser útil para el estudio de ARN *input*. Al mismo tiempo este diseño de experimento permitió evaluar el comportamiento del oligo mímico en estas dos matrices (agua y ARN de cerebro).

La variabilidad en la eficiencia de la RT puede ser debida a la calidad de la muestra de ARN, al diseño del cebador, a la elección de la enzima de la RT o a otros factores (Bustin *et al.*, 2015). Esto refuerza la necesidad de ser rigurosos en estos parámetros experimentales para que los resultados de validez de la RT-qPCR puedan interpretarse adecuadamente.

En el caso del miR-122-5p y miR-223-5p se observó un aumento de los valores de Ct a medida que se incrementó la concentración de cebador (figura 28 y 29 apartado 4.2.4, respectivamente), por lo que los mejores resultados de sensibilidad se obtuvieron cuando se utilizó la concentración de cebador de RT de 50nM. Por otro lado, para cada una de las concentraciones evaluadas los valores de Ct fueron muy similares en las dos matrices estudio. En el caso de los NTCs en la matriz de ARN de cerebro los valores de Ct también aumentaron a medida que lo hizo la concentración de cebador de RT. En concreto, los Cts obtenidos con 50nM en el NTC fueron de 36 y 38 (aprox.), para el miR-122-5p y miR-223-5p, respectivamente, por lo que cabe pensar que estos dos miARNs se encontraban en esta matriz en concentraciones muy bajas o cercanas al límite de sensibilidad de los cebadores utilizados (figura 28 y 29 apartado 4.2.4, respectivamente).

Por otro lado, respecto al miR-191-5p también se observó este mismo comportamiento de manera que los valores de Ct más bajos se obtuvieron con 50nM de cebador de RT. No obstante, en este caso, para una determinada concentración de cebador de RT, se obtuvo mayor sensibilidad con la matriz de ARN, observándose una diferencia de alrededor de 2Cts entre matrices (figura 30 apartado 4.2.4). Los cebadores y sonda fueron capaces de discriminar 10^7 copias del oligo en agua de 10^7 copias más la expresión del miARN, *background*, en el cerebro.

Por último, en el caso del miR-1306-3p se estudió también la concentración de cebador de RT de 25nM. Esta misma concentración ya se usó en el estudio de especificidad por Qiaxcel y curva de *melting*. Se decidió bajar hasta esta concentración, tal como se ha apuntado anteriormente, ya que con concentraciones más bajas de cebador de RT se reduce la formación de productos inespecíficos al mismo tiempo que se mejora la sensibilidad (Kramer, 2011)(Tang *et al.*, 2006). No obstante, a diferencia de los resultados obtenidos con SYBR Green, en este apartado ni en los resultados con sonda en matriz de agua se observó en el NTC amplificación en ninguna de las cuatro concentraciones de cebador de RT evaluadas (25nM, 50nM, 500nM y 1000nM) (figura 31 apartado 4.2.4). Este miARN al igual que como ocurre con el miR-191-5p, estaba presente en la matriz de ARN de cerebro, lo cual se apreció cuando se amplificó el ARN de cerebro sin haber añadido el oligo mímico (NTC). No obstante, cuando se compararon las dos matrices, para una determinada concentración de cebador, los valores de Ct fueron muy similares, por lo que los cebadores y sonda no fueron capaces de discriminar entre 10^7 copias del oligo de la expresión del miARN más 10^7 copias, lo cual indicaría que el sistema estaba saturado (applied biosystem, 2008). Por lo que respecta a los resultados de sensibilidad en los que se añadió el oligo mímico, en ambas matrices estudio, los valores de Ct más bajos se obtuvieron cuando se utilizó la concentración de cebador de RT de 50nM y 25nM. Se observó un aumento de los valores de Ct en concordancia con el incremento de la concentración de cebador de RT en 500nM y 1000nM (figura 31 apartado 4.2.4).

Resumiendo, el comportamiento del oligo mímico no varió en base a la matriz utilizada ya que en los miARNs miR-122-5p y miR-223-5p que son los dos miARNs que no se expresaron en ARN de cerebro, los resultados de sensibilidad fueron similares en las dos matrices. Por otro lado, la concentración de cebador de RT óptima fue de 50nM ya que es con la que se obtuvieron los valores de Ct más bajos, de manera que esta se eligió para todos los miARNs.

5.4. Validación de la RT-qPCR en el equipo LightCycler 480II (Roche) y comparativa con el equipo QS5 (Thermo Fisher Scientific)

5.4.1. Evaluación de los parámetros de calidad de la RT-qPCR

Optimizadas las dos etapas de la RT-qPCR, se llevó a cabo la validación con todas las condiciones definidas como óptimas, utilizando una curva de calibrado formada por diluciones seriadas 1:10 del oligo mímico preparado en agua, abarcando el rango dinámico de expresión del miARN de interés (Raymaekers *et al.*, 2009)(Kirschner *et al.*, 2011). Se aplicaron dos estrategias, retrotranscripción de todos los puntos de la curva de calibrado y la cuantificación por PCR a partir de: a) cADN sin diluir y b) cADN diluido 1:10. Al final se evaluaron las mismas cantidades

de oligo mímico por lo que se pudo comparar si la sensibilidad que se obtuvo fue la misma aplicando estas dos estrategias.

Normalmente las reacciones de PCR cuantitativa se realizan por triplicado y el criterio que se utiliza para incluir los tres replicados es que la diferencia entre ellos sea menor a 0.5Cts. Sin embargo, en este caso, para ser lo más rigurosos posible, se aplicó, en base a la eficiencia obtenida en la curva de calibrado, un valor máximo de diferencia de Ct entre los tres replicados de cada punto, replicados técnicos (De Ronde *et al.*, 2017). En el caso de que un replicado excediese el máximo permitido, se eliminó y no se utilizó para calcular el valor promedio de Ct de ese punto. El límite se puso en 40 Cts ya que Cts por encima son sospechosos debido a la baja eficiencia implícita, y por lo general, no deben reportarse (Bustin *et al.*, 2009). Por tanto, una vez procesados los datos, estas curvas de calibrado se utilizaron para calcular la pendiente, eficiencia, R^2 y establecer el rango dinámico lineal. Las curvas de calibrado proporcionan una evidencia sencilla, rápida y reproducible de la calidad de la PCR, la sensibilidad analítica y la robustez del ensayo. La eficiencia de la amplificación se determina a partir de la pendiente de la recta correspondiente a la parte lineal (Bustin *et al.*, 2009)(Roche, 2009). En otras palabras, la eficiencia de la PCR proporciona una buena estimación del grado de amplificación durante cada ciclo y de la calidad de la reacción (Roche, 2009).

5.4.1.1. Evaluación de la pendiente

En primer lugar, respecto a los valores de pendiente de las curvas de calibrado obtenidos en la plataforma Roche, el rango obtenido estuvo de -3.3 a -3.8 y de -3.6 a -4.0 para la curva construida sin diluir el cADN (ver tabla 45 apartado 4.3.1.1) y curva con dilución (ver tabla 50 apartado 4.3.1.2), respectivamente. Aunque las guías recomiendan que el rango de la pendiente en una PCR optimizada ha de estar entre $3.6 < m < -3.1$ (Ramon *et al.*, 2018)(Raymaekers *et al.*, 2009)(Abdel Nour and Plaffl, 2020)(Japan, 2004) los estudios publicados en miARNs, son más laxos y las pendientes aceptadas están entre -3.92 y -2.92 (Coulter, 2012) y entre - 2.81 to - 3.17 (Feng *et al.*, 2009). En el estudio comparativo con la tecnología de referencia de Thermo Fisher Scientific, los valores de pendiente promedio obtenidos en las curvas sin diluir estuvieron entre -3.4 y -3.5 (ver tabla 66 apartado 4.4.1.1), mientras que con las curvas diluidas fueron de -3.4 y -3.7 (ver tabla 72 apartado 4.4.1.2). Los valores de pendiente obtenidos fueron muy homogéneos dentro de las curvas sin diluir y las curvas diluidas, incluso entre ellas. Y además, se acercaron más al rango de pendientes óptimo ($3.6 < m < -3.1$) (Ramon *et al.*, 2018)(Raymaekers *et al.*, 2009)(Abdel Nour and Plaffl, 2020)(Japan, 2004).

5.4.1.2. Evaluación de la eficiencia

Por lo que respecta a la eficiencia, es importante considerar que la eficiencia de la reacción puede verse afectada por varios factores como la longitud y la secuencia del amplicón (contenido G/C) y estructuras secundarias (ej. colas poliA), la secuencia y la calidad de los cebadores, errores innatos debidos al pipeteo o pipetas mal calibradas, impurezas o inhibidores en la muestra o a las condiciones de reacción (Abdel Nour and Plaffl, 2020)(Raymaekers *et al.*,

2009)(Smith, 2021). En concreto, cuando la eficiencia es baja puede ser debido a que el diseño de los cebadores no ha sido óptimo (el cebador no aparea 100% con la secuencia diana, no tiene un 100% de complementariedad) o a condiciones subóptimas en la reacción RT-qPCR (Bio-Rad, 2006)(G *et al.*, 2014)(LightCycler® Real-Time PCR Systems Application Manual., 2009)(Smith, 2021). Un ejemplo de esta última podría ser Ta demasiado altas o subóptimas (Taylor *et al.*, 2010). Por el contrario, cuando la eficiencia es superior a 110% normalmente es debido a la presencia de dímeros de cebadores o productos inespecíficos (Taylor *et al.*, 2010)(Smith, 2021). Este comportamiento no se observó en ninguno de los miARNs (ver apartado 4.3.1 para Roche y apartado 4.4.1 para el estudio con el equipo QS5). Sin embargo, algunas guías sitúan este porcentaje límite en el 100% (Bio-Rad, 2006)(Smith, 2021). Aplicando este criterio, se observó en el caso del miR-1306-3p, en el estudio de las curvas con la tecnología de Roche, que en cuatro de las seis curvas de calibrado en las que se aplicó la estrategia de no diluir el cADN el porcentaje de eficiencia era ligeramente superior al 100% (ver tabla 48 apartado 4.3.1.1). Aunque no se observó la presencia de amplificaciones inespecíficas en el NTC, estos porcentajes de eficiencia podrían ser el reflejo de la formación de dímeros de cebadores que se detectaban con SYBR Green pero no con sonda. Aunque no se cuantifiquen porque la sonda es específica, sí se forman lo que hace que se consuman reactivos en la reacción (Smith, 2021)(Abdel Nour and Plaffl, 2020). Sin embargo, atendiendo a los valores de eficiencia obtenidos (criterio que se utiliza para determinar si una PCR está optimizada o no), se pudo concluir que la RT-qPCR para este miARN estaba optimizada.

De forma general, los resultados obtenidos en la plataforma de Roche mostraron valores de eficiencia en el rango de 92% a 101% para las curvas en las que el cADN se amplificó directamente en la PCR (ver tabla 45 apartado 4.3.1.1) y en el rango de 89% a 96% para las curvas en las que el cADN se diluyó previo a ser amplificado (ver tabla 50 apartado 4.3.1.2). No obstante, en todos los replicados el valor de la eficiencia estuvo por encima del 85%, lo cual indicó que la reacción de RT-qPCR era eficiente (Roche, 2009). En otros estudios de miARNs utilizando también la plataforma de LightCycler 480II (Roche) también se refieren eficiencias superiores al 90% (Wang and Zhang, 2012).

En el caso de Thermo Fisher Scientific, los valores de eficiencia abarcaron desde 93-98% y 86-96% aplicando la estrategia de amplificar directamente el cADN en la qPCR (ver tabla 66 apartado 4.4.1.1) y diluir el producto de la RT previo a ser amplificado (ver tabla 72 apartado 4.4.1.2), respectivamente. En definitiva en todos los replicados de las curvas de calibrado para cada uno de los miARNs las eficiencias fueron muy próximas o estuvieron por encima del 85% (Roche, 2009).

En cuanto a la sensibilidad, en el caso del equipo LightCycler 480II de Roche se obtuvieron mejores resultados cuando el cADN se diluyó con agua libre de ARNasas previo a la amplificación (ver figura 32 apartado 4.3.1.2). Esto puede ser debido a la dilución de los inhibidores (Abdel Nour and Plaffl, 2020). No obstante, los parámetros de calidad de eficiencia y pendiente fueron más cercanos a los óptimos, a excepción del miR-223-5p que fueron similares, cuando el cADN se amplificó directamente en la qPCR. Sin embargo, en el caso de Thermo Fisher Scientific los valores de Ct para cada uno de los miARNs fueron más bajos cuando el cADN no se diluyó (ver figura 33 apartado 4.4.1.2). Probablemente, esto sea debido a que el manual de este kit recomienda que el cADN se diluya por lo menos 1:15 (Applied biosystem, 2005). Aun así, cuando

se compararon los valores de Ct de las curvas con cADN diluido de Roche y Thermo Fisher Scientific se alcanzaron mayores niveles de sensibilidad con en el equipo QS5 (ver figura 34 apartado 4.4.2). Cabe tener en cuenta, que Thermo Fisher Scientific es la tecnología de referencia la cual tiene un kit de RT y qPCR específicos para para miARNs, no siendo este el caso de Roche.

Por otro lado, otro aspecto importante que se debe cumplir en la evaluación de una RT-qPCR es que cuando se utiliza el método comparativo de ΔCt y $\Delta\Delta Ct$ las eficiencias de los miARNs candidatos a biomarcadores han de ser similares a la del miARN endógeno de referencia. De este modo, si se cumple este criterio, las reacciones se pueden llevar a cabo sin la necesidad de incluir una curva de calibrado en la propia placa (Thermofisher Scientific, no date)(applied biosystem, 2008)(Smith, 2021). Los resultados obtenidos con las curvas de calibrado en la plataforma de Roche mostraron que la eficiencia del miARN endógeno sin diluir fue de 96% y la de los miARNs estudio de 92%, 94% y 101% (ver tabla 45 apartado 4.3.1.1). Del mismo modo, las curvas con el cADN diluido mostraron eficiencias para el miR-191-5p del 90% y para los miARNs biomarcadores de 89%, 95% y 94% para el miR-122-5p, miR-223-5p y miR-1306-3p, respectivamente (ver tabla 50 apartado 4.3.1.2). Por tanto, sí se cumplió en ambos casos esta condición.

5.4.1.3. Evaluación del rango dinámico lineal

Las curvas de calibrado también se utilizaron para determinar el rango dinámico lineal, que equivale al rango donde los valores de Ct son válidos para la cuantificación del ácido nucleico, en este caso el miARN de interés. Es importante tener en cuenta que la curva de calibrado debe abarcar el posible rango de concentraciones en las que se expresa el miARN en las muestras estudio. De esta manera cuando se lleve a cabo el estudio con muestras reales de plasma, se corroborará que la expresión del miARN está dentro del rango dinámico estudiado analíticamente (Bio-Rad, 2006)(Abdel Nour and Plaffl, 2020)(Roche, 2009). Por ello, en este caso se evaluaron las cantidades de 10^8 - 10^3 copias de oligo mímico del miARN miR-191-5p, miARN con expresión constitutiva en plasma (Blondal *et al.*, 2013) y el rango de 10^7 - 10^2 para el resto de miARNs candidatos a biomarcadores. Para evaluarlo adecuadamente, se necesita un mínimo de 3 réplicas y de 4 logaritmos de la concentración de plantilla (Thermofisher Scientific, 2015)(Bustin *et al.*, 2009)(Roche, 2009), ya que una posible variación matemática o artefacto en la pendiente afecta más la eficacia de la reacción y con ello a la sensibilidad cuando se analizan diluciones por debajo de 4 logaritmos. En este trabajo el rango dinámico lineal estudiado abarcó 6 puntos y cada uno de ellos se analizó en la qPCR por triplicado, lo cual se recomienda para que el ensayo sea robusto (Raymaekers *et al.*, 2009)(Taylor *et al.*, 2010)(Mussbacher *et al.*, 2020)(Kralik and Ricchi, 2017b). El realizar replicados de cada una de las curvas de calibrado ayuda a aumentar la confianza en la estabilidad del ensayo, por ello se llevaron a cabo para cada miARN 6 reacciones de RT-qPCR (Roche, 2009).

En concreto, en la plataforma LightCycler 480II de Roche, tanto en las curvas sin diluir como en las diluidas, el rango dinámico lineal abarcó 4-5 puntos (apartado 4.3.1). En el caso de los resultados obtenidos en QS5 (Thermo Fisher Scientific) el rango dinámico lineal abarcó 5-6

puntos (apartado 4.4.1). Cumpliéndose por tanto en ambas plataformas el número de puntos mínimo que ha de tener el rango dinámico lineal.

5.4.1.4. Evaluación de R²

Finalmente, el último parámetro analítico esencial para evaluar la optimización de la PCR es el valor del coeficiente de correlación, R², que se refiere a qué tan bien los valores de Ct definidos experimentalmente se correlacionan con la serie de diluciones (o qué tan bien los puntos “se ajustan a la recta”). Para ensayos y resultados de calidad, el valor R² debe ser ≥ 0.980 . Cuando el R² es < 0.980 , en la mayoría de los casos se debe a puntos de datos atípicos o a la variabilidad del pipeteo. Tanto en la plataforma de Roche como en el QS5, el valor de R² promedio fue mayor a 0.98 (apartados 4.3.1 y 4.4.1 respectivamente) (Kralik and Ricchi, 2017a)(Bio-Rad, 2006)(Taylor *et al.*, 2010)(Coulter, 2012)(Japan, 2004). Por tanto, en todos los casos los puntos en n^o de copias que conforman la curva de calibrado se ajustaron a la recta.

En ninguno de los miARNs evaluados en la plataforma de Roche fue necesario eliminar ningún punto de los extremos de las curvas para obtener valores de R² aceptables (Abdel Nour and Plaffl, 2020). No obstante, puesto que el equipo LightCycler 480II (Roche) no proporciona el valor de R² se realizó el ajuste polinómico de grado 2 de los puntos con la herramienta Excel (Microsoft Office). En algunos casos, como es el miR-122-5p en las curvas sin diluir y del miR-1306-3p con estas curvas y también en las curvas con cADN diluido los dos últimos puntos de la curva de calibrado no se separaron (ver figura 32 apartado 4.3.1.2).

En definitiva, con las condiciones de RT y qPCR determinadas a lo largo del proceso de optimización en la plataforma de Roche, se pudo concluir que el ensayo de RT-qPCR se optimizó ya que se cumplieron los criterios analíticos de calidad de pendiente, eficiencia y R² discutidos anteriormente. Por tanto, cumpliendo estos requisitos se pasó a calcular el LOC y LOD, así como evaluar la precisión del ensayo. En concreto, la guía ICH recoge esta definición y la metodología para la validación de un procedimiento analítico, no obstante en ella se indica que la complejidad analítica de los procesos biológicos puede conllevar a otras estrategias (ICH, 1995). Por ello, se abordó la evaluación de los parámetros analíticos en base a la información recogida en estas guías y a los estudios publicados de RT-qPCR, así como de miARNs que se ajustan al trabajo que aquí se desarrolla. De cualquier modo, el objetivo principal de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que el procedimiento es adecuado para su finalidad (ICH, 1995).

5.4.2. Evaluación del cálculo LOC y LOD

Existen varios métodos para calcular el LOD y LOC descritos por agencias como la FDA (*Food and Drug Administration*), AOAC (*Association of Analytical Communities*), USP (*United States Pharmacopoeia*), IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) e ICH (ICH, 1995). Atendiendo a la guía ICH se pueden calcular el LOD y el LOC por evaluación visual, en base al ratio *señal/ruido* y en base a una curva de calibrado atendiendo a la desviación estándar de la respuesta y la pendiente (ICH, 1995)(Shrivastava and Gupta, 2011).

Sin embargo, estos métodos clásicos consideran la lectura en el blanco para el cálculo del LOD y LOC y son aplicables en la detección de analitos químicos, no siendo adecuado el enfoque para qPCR, debido a que la lectura en tiempo real del NTC no debe de dar positiva, es decir debe ser indeterminada (Burns and Valdivia, 2008).

Por ello, según la norma ISO 20395 el LOC y LOD se calcula a partir del análisis de réplicas de concentraciones/cantidad de muestra en la parte inferior del rango lineal de la curva de calibrado. La precisión de las estimaciones de LOC depende del número de repeticiones realizadas en cada concentración y del incremento de concentración entre las muestras, siendo recomendable realizar un mínimo de 10 repeticiones en cada concentración con pequeños incrementos en la concentración (dos veces por encima y por debajo de la concentración esperada para el LOC) (ISO, 2019). Los datos medidos se transfieren a un formato binario que indica las PCR positivas y negativas y se calcula la fracción de resultados positivos en cada concentración/cantidad, siendo el LOD y el LOC la concentración más baja a la que el 95 % de las réplicas son positivas (Abdel Nour and Plaffl, 2020)(ISO, 2019). En otras palabras, dentro de un grupo de replicados que contengan el miARN diana en la concentración/cantidad definida de LOD y LOC, no deberían producirse más de un 5% de reacciones fallidas.

Sin embargo, en el estudio de miARNs por RT-qPCR debido a que el ruido de fondo del NTC no es constante y puede variar entre experimentos se pueden utilizar aproximaciones similares a las descritas en la ICH basados en este ruido de fondo. La primera de ellas basada en la pendiente de la curva de calibrado (K Kelnar *et al.*, 2014) y la segunda, en un árbol de decisión (Wolfinger *et al.*, 2018).

Aplicar la primera estrategia en este trabajo para determinar el LOC y LOD supuso que los que NTCs tuviesen un valor de Ct (K Kelnar *et al.*, 2014), por lo que se asignó Ct de 40 cuando el NTC se reportó como indeterminado en el equipo LightCycler 480II. En el caso de los ensayos con QS5, aunque el equipo reporte Cts mayores a 40, se asumió Ct de 40, para que ambas plataformas se le pudiese aplicar el mismo procedimiento.

5.4.2.1. Cálculo del LOC y LOD en el equipo LightCycler 480II (Roche)

Aplicando la primera estrategia para el cálculo de LOC y LOD los resultados con el equipo LightCycler 480II de Roche mostraron que el LOC y LOD se situó en 10^3 copias en el caso de los miARNs miR-122-5p y miR-191-5p, y en 10^2 copias en el miR-223-5p (tabla 56, 57 y 58 apartado 4.3.2). Mientras que con el miR-122-5p, miR-223-5p y miR-191-5p los resultados fueron coherentes, no ocurrió lo mismo en el caso del miR-1306-3p, ya que en cuatro de las seis curvas de calibrado el punto de 10^2 copias no se detectó por lo que el LOC y LOD no podían estar en ese rango (tabla 59 apartado 4.3.2). En este miARN los últimos puntos de la curva de calibrado no se separaron. En este caso, aunque, como ya se ha descrito no se observaron amplificaciones inespecíficas en el NTC, la mejora de la especificidad de cebadores, conduciría a un aumento en la sensibilidad y por tanto a un incremento del rango dinámico lineal y del LOC al reducir la competición de los componentes de la master mix entre los productos específicos y no específicos lo cual explicaría por qué las cantidades más bajas en número de copias no se llegaron a detectar y cuantificar con precisión (Smith, 2021)(Abdel Nour and Plaffl, 2020).

5.4.2.2. Cálculo del LOC y LOD en el equipo QS5 (Thermo Fisher Scientific)

En cambio, los resultados con los componentes y equipo QS5 mostraron que el LOC y LOD en los miARNs miR-223-5p y miR-1306-3p estaba en el rango de 10^2 (tabla 79 y 80 apartado 4.4.3, respectivamente), mientras que en el miR-191-5p, el LOC estuvo en el rango de 10^3 copias y el LOD en 10^2 copias totales de oligo mimico (tabla 81 apartado 4.4.3). Al igual que con el miR-1306-3p en Roche, la interpretación de los resultados del miR-122-5p en el equipo QS5 no fue coherente ya que el LOC y LOD aunque se situó en el rango de 10^3 , esto equivalía a un Ct de 40, y este valor es el que se asignó arbitrariamente al punto de 10^2 copias (ver tabla 78 apartado 4.4.3). Por ello, para que los resultados fuesen coherentes y ver si se reproducían los valores de LOC obtenidos se aplicó la estrategia basada en el *threshold* (Wolfinger *et al.*, 2018).

5.4.2.3 Cálculo del LOC en Roche y QS5 en base al *threshold*

Aplicando esta estrategia, en el caso de Roche se reprodujeron los resultados obtenidos en los miARNs miR-122-5p, miR-223-5p y miR-191-5p. En el caso del miR-1306-3p se obtuvo un LOC de 10^3 copias lo cual sí tenía sentido en base a los valores de Ct obtenidos en las curvas de calibrado (ver tabla 60 apartado 4.3.3). Por lo que respecta a los resultados obtenidos en el equipo QS5, también se reprodujeron los valores de LOC en los miARNs miR-223-5p, miR-1306-3p y miR-191-5p. No obstante, en el miR-122-5p aunque se reprodujo el LOC de 10^3 , al no utilizar este método un valor de Ct, sí tenía coherencia que este fuese el LOC (ver tabla 82 apartado 4.4.4).

En definitiva, aunque se aplicaron los dos métodos para el cálculo del LOC independientemente del comportamiento de los NTCs, siendo estrictos los resultados válidos en los casos en los que el NTC no dio señal serían los obtenidos a partir del método descrito por Wolfinger y colaboradores ya que contempla que los NTCs se reporten como indeterminados (Wolfinger *et al.*, 2018).

En general, cabe tener en cuenta que el LOC y LOD se determinó, tanto para Roche como para la plataforma QS5, aplicando la estrategia de diluir el cADN 1:10 ya que es con la que se obtuvieron los mejores resultados de sensibilidad en la plataforma de Roche. Sin embargo, en QS5 esta no fue la estrategia con la que se obtuvo mayor sensibilidad por lo cual esto hace pensar que si se hubiese evaluado con qué estrategia se obtiene mayor sensibilidad en esta plataforma, y se hubiese aplicado para el cálculo de LOC y LOD, se podría haber llegado al LOC y LOD de la PCR, que, de acuerdo con la distribución de Poisson, en una PCR el LOD no puede ser inferior a tres copias del ácido nucleico diana (Bustin *et al.*, 2009).

Otra de las limitaciones del estudio es que la determinación del LOC y LOD debe resultar del desarrollo del método experimental en su totalidad, que incluye la preparación de ácidos nucleicos (purificación de los miARNs) y la RT-qPCR. Solo si se tienen en cuenta la eficiencia de todos los pasos el LOC y LOD puede representar ser un parámetro que describa las características del método de RT-qPCR respectivo, y se puede expresar en unidades relevantes para el experimento, como copias por nanogramo de tejido. En este caso se abarcó la fase de RT y qPCR no siendo así con la fase de purificación de miARNs puesto que se trabajó con soluciones de los oligos mimicos en agua (Bustin *et al.*, 2009)(Kralik and Ricchi, 2017a).

5.4.3. Repetitividad (variación intraensayo) y reproducibilidad (variación interensayo)

Un procedimiento analítico también conlleva la evaluación de la precisión, la cual mide la proximidad, concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas a partir de muestreos múltiples de la misma muestra en unas condiciones prescritas (ICH, 1995). Para llevar a cabo este experimento se utilizó esta información junto con los estudios publicados para miARNs (Ramon *et al.*, 2018)(Wang and Zhang, 2012)(Le Carré, Lamon and Léger, 2014). En concreto se midieron los parámetros de repetitividad y reproducibilidad. Aunque se recomienda el uso de muestras reales se pueden utilizar alternativamente muestras preparadas artificialmente, realizándose en este caso una aproximación al utilizarse agua a la que se le añadió cantidades conocidas del oligo mímico del miARN. En concreto, para la evaluación de la repetitividad, o variación intraensayo, se evaluó la variabilidad de un punto dentro del mismo ensayo, es decir, la variabilidad de los triplicados, expresada como SD (Bustin *et al.*, 2009). En general se observó una mayor variación, a medida que disminuyó la cantidad de oligo mímico estudiada. Aunque la precisión de un ensayo puede variar por distintos factores como puede ser las diferencias de temperatura, normalmente la precisión varía con la concentración de analito (Abdel Nour and Plaffl, 2020).

En el caso de la reproducibilidad o variación interensayo se evaluó la variación de un punto entre las distintas curvas de calibrado en distintos ensayos (Bustin *et al.*, 2009), utilizándose por tanto los valores de Ct de dichas curvas (Hue *et al.*, 2016)(Le Carré, Lamon and Léger, 2014). Sin embargo, la reproducibilidad requiere el análisis de muestras o de una matriz a la que se añade el analito de estudio en cuatro niveles distintos: alto, medio, bajo (cerca del LOD) y el control negativo (Kralik and Ricchi, 2017a)(Ramon *et al.*, 2018). Además, la reproducibilidad implica la participación de distintos analistas, laboratorios y equipamiento (Bustin *et al.*, 2009)(Barwick *et al.*, no date). En definitiva, la evaluación de la precisión es un proceso de gran envergadura. En este caso, solamente se llevó a cabo una primera aproximación calculando la SD para cada uno de los puntos en las seis curvas de calibrado por lo que son necesarios más estudios.

5.5. Estudio de isomiRs

Dado que los cebadores y sondas de PCR diseñados para una secuencia diana también pueden unirse a secuencias similares, la especificidad de la PCR suele verificarse *in silico* y experimentalmente. *In silico* suele analizarse la especificidad frente a la base de datos de referencia. En el caso de los miARNs a menudo forman familias de secuencias estrechamente relacionadas que pueden diferir solo de 1 pb a 2 pb (isomiR), por lo que la especificidad del ensayo de miARN se comprueba *in silico* frente a otros miembros de la misma familia de miARN para predecir el grado de reactividad cruzada e informar las pruebas *in vitro*. También debe verificarse la especificidad del ensayo para el miARN maduro en comparación con sus formas de miARN primario y precursor (ISO, 2019). En este estudio solo se identificaron isoformas para el miR-122-5p y el análisis bioinformático reveló que este miARN no se expresaba en el plasma por lo que no se llevó a cabo un estudio experimental.

5.6. Evaluación de las cantidades de entrada (*input*) de ARN y cADN

El proceso de optimización para la cuantificación de miARNs no solo depende de la RT-qPCR sino también del proceso de extracción, con lo cual, la selección del método o kit de extracción y purificación es importante para la calidad del proceso. En esta tesis se eligió el kit miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen) teniendo en consideración el tipo de muestra de partida, la calidad de la misma, así como los requisitos experimentales posteriores en base a la tecnología RT-qPCR de cuantificación (El-Khoury *et al.*, 2016)(Bryzgunova *et al.*, 2021)(Dellest and Simpson, 2016)(Redshaw *et al.*, 2013)(Abdel Nour and Plaffl, 2020).

En la literatura se dispone de varios estudios comparativos con otros kits como Plasma/Serum RNA Purification Mini Kit (Norgen Biotek), Direct-zol™ RNA MiniPrep kit (Zymo Research), NucleoSpin™ miRNA Plasma (Macherey-Nagel) kit, Serum Circulating RNA Purification Kit (Norgen Biotek) que han demostrado que con el kit miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen) se obtiene una mayor concentración de ARN y recuperación de miARNs (Meerson and Ploug, 2016)(Tan, Khoo and Tan, 2015). Se trata, además, de un kit ampliamente utilizado en estudios de miARNs en los que se utiliza la tecnología Taqman (Murray *et al.*, 2015)(Murray *et al.*, 2018)(Tan, Khoo and Tan, 2015), y que ha sido usado previamente en estudios propios de miARNs en muestras suero /plasma (J. L. García-Giménez *et al.*, 2018)(Seco-Cervera *et al.*, 2018). Sin embargo, otros estudios en los que se evalúan miARNs en estos biofluidos, optan por *mirVana*™ PARIS™ Kit (Ambion) y *mirVana*™ miRNA isolation kit (Applied Biosystems, Inc.) también basados en columnas, al demostrar que se obtiene un mayor rendimiento con estos kits (McDonald *et al.*, 2011)(Kramer, 2011).

Para este experimento se utilizó ARN de dos procedencias distintas, ARN comercial (ARN de cerebro) y ARN obtenido por un proceso de extracción/purificación con el kit antes mencionado a partir de una mezcla comercial de plasma humano. El primero de ellos se seleccionó ya que ha sido utilizado en estudios de optimización de RT-qPCR en miARNs (Ramon *et al.*, 2018), y además previamente se identificó la presencia de dos de los miARNs de interés en esta matriz (ver apartado 4.2.4 optimización de la concentración de cebador de RT). En el caso de la mezcla plasma comercial humano se trata de una aproximación al fluido biológico con el que se plantea la identificación de los biomarcadores de EIA, y además en él se podía evaluar el comportamiento de otros miARNs de interés que no se expresan en el ARN de cerebro.

El estudio de ARN *input* se realizó con cantidades que abarcaron desde 100ng hasta 6.25ng de ARN (Le Carré, Lamon and Léger, 2014)(Ramon *et al.*, 2018). En el ARN de cerebro los valores de Ct de los miARNs permanecieron estáticos en el caso del miR-1306-3p. En este miARN, el sistema estaba saturado y aunque aumentase la cantidad de ARN en la RT no se podían cuantificar dichas diferencias. La capacidad es una variable analítica, un estándar que hace referencia a la cantidad máxima de ARN que puede añadirse a la reacción de transcripción inversa sin que se pierda la eficiencia en la RT. Cuando se excede dicha capacidad, que es lo que aquí ocurre, la química puede perturbar las relaciones cuantitativas entre las especies de ARN y conducir a errores en la cuantificación del mismo (applied biosystem, 2008). En el caso del miR-191-5p, los valores de Ct bajos fueron debidos a que este miARN es muy abundante en cerebro (Kumar and Reddy, 2016). Se observó un aumento de Ct en el miR-191-5p cuando disminuyó la cantidad de ARN *input*.

Por otro lado, los resultados obtenidos para los miARNs miR-122-5p y miR-191-5p en la matriz de plasma comercial mostraron que los valores de Ct variaron en función de la cantidad de ARN de entrada, incrementándose cuando disminuyó la cantidad de entrada de ARN en la RT. La mayor sensibilidad se obtuvo con 100ng, con valores de Ct de 33 y 34 para el miR-122-5p y miR-191-5p, respectivamente. No obstante, estos valores reflejaron una baja sensibilidad en particular para el miR-191-5p el cual es un miARN endógeno con una expresión constitutiva en plasma. Sin embargo, se debe considerar que se trata de una mezcla de plasma humano en la que no se especifican las características de los donantes, el método de extracción, el protocolo de procesamiento (centrifugaciones para eliminar el *debris*), y pureza, etc., lo cual puede hacer pensar que este plasma pudiera no cumplir todos los requisitos de calidad para llevar a cabo este estudio. Además, cabe tener en cuenta que el proceso de extracción de miARNs se indica como uno de los pasos menos reproducibles y con el que se introduce mayor imprecisión y mayor variabilidad (McDonald *et al.*, 2011). Por otro lado, en este proceso de extracción no se utilizó un *carrier*, el uso del cual podría facilitar la recuperación de miARNs. En la literatura se ha documentado que puesto que la cantidad de miARNs circulantes en suero/plasma es baja (Glinge *et al.*, 2017b) y el rendimiento en la extracción también lo es, una purificación más robusta requiere el uso de un *carrier*. Una posible pérdida relativa de miARNs debido a la adsorción a los filtros y al plástico podría ser debida a la ausencia de este *carrier* en el proceso de extracción, el cual además, aumenta la complejidad del ARN de la muestra, lo cual evita la formación de dímeros de cebadores y mejora la reproducibilidad (Blondal *et al.*, 2013)(Andreasen *et al.*, 2010)(Poel *et al.*, 2018). En definitiva, con el uso de un *carrier* aumenta el rendimiento del proceso de extracción, que hace que el proceso sea más robusto y reproducible (Andreasen *et al.*, 2010). Son numerosos los estudios publicados que utilizan *carriers* como el Bacteriófago MS2, glicógeno, ARNt de levadura para aumentar el rendimiento de la extracción (Murray *et al.*, 2015)(Shah, Soon and Marsh, 2016)(Kirschner *et al.*, 2011)(Murray *et al.*, 2018)(Myklebust *et al.*, 2019a).

Finalmente, en ninguno de los miARNs se observó saturación del sistema. Probablemente esto sea debido a las diferencias propias de la matriz biológica y a que las cantidades en ng del ARN de cerebro y ARN de plasma comercial no eran equivalentes. El primero de ellos fue cuantificado y evaluado con el Bioanalyzer, mientras que el segundo, el ARN se cuantificó en el laboratorio por espectrofotometría en NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific). Los métodos espectrofotométricos no son los más adecuados para la cuantificación de miARNs circulantes ya que el rendimiento de la extracción en muestras de suero/plasma está por debajo del límite de cuantificación precisa de estos métodos por lo que se recomienda en estudios con muestras de suero/plasma utilizar una cantidad fija de volumen de ARN (Marabita *et al.*, 2016)(Moldovan *et al.*, 2014)(Mitchell *et al.*, 2008)(Kroh *et al.*, no date)(Le Carré, Lamon and Léger, 2014)(Kroh *et al.*, no date)(El-Khoury *et al.*, 2016)(Glinge *et al.*, 2017b).

Para esclarecer cuál era la mejor dilución del cADN en la qPCR para la cuantificación de los miARNs se recurrió a una curva con diferentes niveles de dilución del producto de la RT de 100ng de ARN. En el caso del ARN de cerebro, se observó para los miARNs miR-191-5p y miR-1306-3p, un comportamiento lineal, un aumento de los valores de Ct desde 100ng al punto correspondiente de diluir 1:100 el cADN. En el caso de ARN obtenido del plasma humano, para ambos miARNs, miR-122-5p y miR-191-5p, se observó un comportamiento lineal a partir de la dilución 1:10 con valor de Ct ligeramente más bajo en este punto que en el cADN sin diluir. Este

resultado puede ser debido a que cuando se incluye el cADN sin diluir en la qPCR también se introducen inhibidores en la PCR (*Your reverse transcription may not be optimal* | Thermo Fisher Scientific - ES, no date)(Abdel Nour and Plaffl, 2020)(Blondal *et al.*, 2013). Por tanto, si no se diluye la muestras esto conduciría a un aumento de la concentración de inhibidores, los cuales afectan a la síntesis de cADN y/o a las reacciones de PCR en tiempo real (ej. inhibiendo la actividad de la polimerasa)(Bio-Rad, 2006)(Thermofisher Scientific, 2015)(Kralik and Ricchi, 2017a). Estos inhibidores se derivan del biofluido, en este caso plasma, o se introducen a través del arrastre de reactivos durante la preparación de la muestra y el aislamiento/proceso de extracción subóptimo del ARN. Es por ello que se recomienda la dilución del cADN (Bustin *et al.*, 2009)(Blondal *et al.*, 2013)(Abdel Nour and Plaffl, 2020)(Dellett and Simpson, 2016). No obstante, para muestras complejas como muestras de suero y plasma no se recomienda diluir el cADN más de 40 veces (40x) (Abdel Nour and Plaffl, 2020).

5.7. Evaluación de la sensibilidad y especificidad del método de RT-qPCR optimizado en la plataforma LightCycler480II (Roche) con muestras de plasma de pacientes EIA

Una vez optimizados los parámetros analíticos de la RT-qPCR, el paso siguiente fue la evaluación de la RT-qPCR con muestras reales. Las medidas para el control de las variables preanalíticas, desde la toma de la muestra de plasma de EIA hasta su conservación a -80°C , y las analíticas durante el procesamiento fueron definidas y asumidas para garantizar la calidad de las muestras y de todo el proceso de análisis. La purificación de miARNs se realizó también con el kit miRNeasy serum/plasma kit (Qiagen), y se corroboró que la cuantificación por espectrofotometría era de entre 20-30ng/ μL .

En este experimento se comparó la sensibilidad obtenida, en valores de Ct, al utilizar 100ng de ARN *input* en la RT y los Cts obtenidos de diluir 1:10 el producto de cADN obtenido de 100ng ya que con estas dos estrategias es con la que se obtuvo un menor valor de Ct.

En el proceso de extracción de los miARNs se adicionó el miARN Cel-miR-39 después de los agentes desnaturalizantes, de manera que se sometió a las mismas condiciones que los miARNs endógenos. De esta forma se monitorizó y evaluó la eficiencia de la extracción. Este miARN también suele usarse para monitorizar la eficiencia de la RT-PCR, si se añade después de la extracción, así como para la normalización de los resultados, en combinación con miARNs controles endógenos (Marabita *et al.*, 2016)(Poel *et al.*, 2018)(Murray *et al.*, 2015). Exhibe a su vez la característica de no ser sensible a la hemólisis al ser un ARN exógeno, lo cual garantiza su validez como control aún con muestras hemolíticas (McDonald *et al.*, 2011)(MacLellan *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos demostraron que la extracción había sido homogénea en todas las muestras ya que el valor de Ct para este miARN fue similar, lo cual se puede observar también en la baja longitud de las barras de error de la figura en el que se representa (figura 37 apartado 4.7).

Los resultados mostraron para los 5 miARNs evaluados, menor valor de Ct con la cantidad de 100ng de ARN. En base a que el rendimiento de la extracción con las muestras estuvo entre 20-30ng/ μL se decidió utilizar un volumen fijo de entrada de ARN eluído de 4 μL , lo cual equivaldría

a unos 100ng aproximadamente. Sin embargo, otros estudios de miARNs la cantidad de ARN que utiliza para la RT-qPCR es menor de entre 10-50ng totales (Applied biosystem, 2005)(Androvic *et al.*, 2017)(Ramon *et al.*, 2018)(Mompeón *et al.*, 2020).

En definitiva, para compensar las variaciones de la baja cantidad de miARNs en los biofluidos se utilizó un volumen constante de ARN *input* y para monitorizar el ensayo se añadió el Cel-miR-39 (Glinge *et al.*, 2017b). Estas condiciones se aplicaron a la validación del ensayo de funcionamiento del kit ScoliPro®.

5.8. Evaluación del funcionamiento del kit ScoliPro® en muestras de pacientes EIA

Una vez aprobado el protocolo de estudio por parte del CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe y del Hospital Universitario Doctor Peset se realizó la formación del personal de enfermería implicado en el estudio con el objetivo de asegurar que el método de extracción de las muestras de sangre fuese homogéneo durante todo el ensayo, considerando que diferentes hospitales pueden usar distintos equipos y procedimientos que conducen a variaciones en la toma de las muestras y que pueden tener consecuencias críticas en el rendimiento del test.

La validación de la función diagnóstico y pronóstico del kit ScoliPro® se realizó con el formato del kit y las condiciones de RT-qPCR optimizadas. En la evaluación de la función diagnóstico se evaluó un total de 52 pacientes (en los tres tiempos estudio, t0, t1 y t2) y 20 sujetos control. Aunque el tamaño muestral se definió en 50 pacientes, para la función pronóstico se evaluaron 40 pacientes de EIA, todos ellos procedentes del Hospital La Fe. El resto de los pacientes provenientes del Hospital Dr. Peset no se pudieron evaluar debido a no disponer de todos los datos clínicos en el CRDe.

5.8.1. Evaluación de la función diagnóstica

En primer lugar, se evaluó la función diagnóstica con las muestras de EIA del tiempo 0, en el momento de ser reclutados los pacientes en el estudio. Puesto que no se disponía de datos previos, se utilizó en la estrategia de normalización, el normalizador miR-191-5p y la media geométrica de este miARN junto con el Cel-miR-39 con el objetivo de ver con cuál de ellas se obtenía mayor sensibilidad, especificidad y AUC y poder aplicar dicha estrategia al resto de tiempos y a la evaluación de la función pronóstico. En todos los miARNs evaluados, los resultados obtenidos mostraron mayor sensibilidad y especificidad cuando se utilizó la normalización frente al miARN endógeno, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas en ambas estrategias al comparar el grupo pacientes y el grupo control. En particular, respecto al miR-122-5p se obtuvo una sensibilidad del 77% y una especificidad de 78% aprox., con un AUC de 0.82 cuando se utilizó como normalizador el miR-191-5p. En cambio, cuando se utilizó la media geométrica de este miARN junto con el Cel-miR-39, todos estos parámetros fueron más bajos, con una sensibilidad de 68% y una especificidad de 76% y un AUC

de 0.68. En cuanto al miR-223-5p, al utilizar el miR-191-5p como normalizador se obtuvo un 73% y 79% de sensibilidad y especificidad, respectivamente, con un AUC de 0.80. Al utilizar la media geométrica como normalización, la sensibilidad fue de 68% y la especificidad de 71% y el AUC de 0.72. Finalmente, respecto al miR-1306-3p, se observó este mismo comportamiento. Se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 86% y 73%, respectivamente, con un AUC de 0.87 cuando se utilizó el miR-191-5p como normalizador. En cambio, al utilizar la media geométrica como estrategia de normalización, los valores de sensibilidad fueron de 85% y especificidad de 72% (aprox.) con un AUC de 0.78.

En todos ellos y para las dos estrategias de normalización aplicadas los valores de *cut off* estuvieron por encima de 1. En concreto, cuando se utilizó la estrategia de utilizar el miR-191-5p como normalizador, los valores de *cut off* fueron 1.89, 2.49 y 2.02 para los miARNs miR-122-5p, miR-223-5p y miR-1306-3p, respectivamente.

De acuerdo con estos datos, se procedió en segundo lugar a calcular la función diagnóstica con las muestras EIA de tiempo 1 utilizando como normalizador el miR-191-5p. Al igual que con el tiempo 0, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en los tres miARNs evaluados, miR-122-5p, miR-223-5p y miR-1306-3p, entre el grupo casos y grupo control. Los resultados obtenidos mostraron, en el caso del miR-122-5p una sensibilidad de 52% y una especificidad de 58% aproximadamente. El análisis de la curva ROC mostró un AUC de 0.59. Por lo que respecta al miR-223-5p los valores de sensibilidad y especificidad fueron de 60% y 79%, respectivamente con un AUC de 0.71. Finalmente, en el caso del miR-1306-3p la sensibilidad fue de 64% y la especificidad de 58%. El análisis de la curva ROC mostró un AUC de 0.65. En general estos parámetros fueron más bajos, en los tres miARNs en este tiempo respecto a t0.

En cuanto a los valores de *cut off*, fueron de 1.12, 0.73 y 1.38 para los miARNs miR-122-5p, miR-223-5p y miR-1306-3p, respectivamente.

Finalmente, se evaluó el tiempo 2, en el que, al igual que el en tiempo 0 y 1 se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el miR-122-5p y miR-1306-3p entre el grupo casos y grupo control. Por lo que respecta al miR-122-5p se obtuvo una sensibilidad de 85% y especificidad de 66% con un AUC de 0.77. En el caso del miR-1306-3p, se obtuvo una sensibilidad de 82% y especificidad de 71%. Los resultados de la curva ROC indicaron un AUC de 0.83. Los valores de *cut off* fueron de 1.24 y 1.77 para los miARNs miR-122-5p y miR-1306-3p respectivamente. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del miR-223-5p en los dos grupos estudio.

En definitiva, el comportamiento de los miARNs miR-122-5p y miR-1306-3p fue estable a lo largo del seguimiento del estudio. Sin embargo, los resultados obtenidos para el miR-223-5p mostraron que en este miARN el comportamiento durante los tres tiempos del estudio no fue estable. Aunque la interpretación biológica de los resultados supone un reto importante en los estudios de miARNs en biofluidos (Chorley *et al.*, 2021), en este caso, la implicación de miR-122-5p, miR-223-5p y miR-1306-3p en rutas moleculares del metabolismo óseo está bien documentada (J. L. García-Giménez *et al.*, 2018). En concreto, estos miARNs regulan genes de la ruta Wnt/ β -catenina, ruta clásica de diferenciación de los osteoblastos. De hecho, el miR-122-5p inhibe la activación de esta ruta (G, Y and Y, 2014)(Almeida *et al.*, 2005). En el caso del miR-223-5p regula, en esta misma ruta, el gen que codifica para el factor de crecimiento de

fibroblastos 2 (FGF2) y PCGF3 (Fei *et al.*, 2011)(Agas *et al.*, 2013)(Zhang *et al.*, 2010). Además regula genes específicos de los osteoclastos como PU.1, RANKL, NFATc1, TRAP, c-Jun, cathepsina K (Sugatani and Hruska, 2007). Finalmente el miR-1306-3p también regula el gen que codifica para la proteína Rac2 implicada en la ruta Wnt/ β -catenina (Itokowa *et al.*, 2011) y la proteína BMP1, relacionada con el crecimiento del hueso y del cartílago (Tabas *et al.*, 1991).

5.8.2. Evaluación de la función pronóstica

En primer lugar, por lo que respecta al tiempo 0, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los miARNs estudio. En cambio, en el tiempo 1 y 2 se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes progresivos y no progresivos cuando se evaluó el miR-1306-3p. Por lo que respecta al tiempo 1, la sensibilidad y especificidad obtenidas fueron de 63% y 57%, respectivamente con un valor de *cut off* de 3.46. El análisis de la curva ROC mostró un AUC de 0.54. En el caso del estudio con las muestras de tiempo 2, los resultados mostraron una sensibilidad de 63% y una especificidad de 69% con un valor de *cut off* de 2.43 y un AUC de 0.64. Probablemente, se haya producido una variación en la expresión de este miARN con posterioridad a la toma de la muestra en tiempo 0.

Estos resultados podrán ser validados con una cohorte mayor en el estudio multicéntrico que se está llevando a cabo actualmente con distintos hospitales.

5.9. Limitaciones del estudio y consideraciones generales

Se estima que esta propuesta de ensayo de RT-qPCR podría ser objeto de otros procesos de optimización para la cuantificación más sensible y específica de los miARNs. Uno de los pasos sería aplicar un paso previo de preamplificación ya que esta etapa mejora la sensibilidad de la detección en muestras en las que la expresión de los miARNs es baja como es el caso de muestras de suero/plasma (Tan, Khoo and Tan, 2015)(Cheng *et al.*, 2013). De hecho, se aplica este tipo de estrategia para el análisis de miARN tanto con la tecnología Taqman como con SYBR Green (Le Carré, Lamon and Léger, 2014)(Murray *et al.*, 2015)(Myklebust *et al.*, 2019a). Además, el uso de sondas MGB aumentaría la especificidad del ensayo ya que se unen al surco menor en el extremo 3' lo cual hace que la unión con la secuencia diana sea más estable y aumente la T_m de la sonda. Además el *quencher* no fluorescente en el extremo 3' disminuye el ruido de fondo lo cual resulta en una mayor precisión de la cuantificación (Kramer, 2011)(Applied biosystem, 2005)(applied biosystem, 2008). En esta misma línea, puesto que la expresión de los miARNs es baja, un método alternativo sería utilizar la técnica de ddPCR con la que se puede alcanzar niveles de sensibilidad más bajos. De hecho, esta estrategia se plantea en futuras versiones del kit ScoliPro®.

No obstante, se han evaluado algunas variantes de la RT-qPCR para mejorar la sensibilidad y especificidad como es el caso de la variante de PCR en *touchdown* PCR y RT pulsátil, sin embargo, no hubo una mejora en los resultados. En concreto, la RT pulsátil se utiliza para aumentar la eficiencia de la reacción de RT y reducir las interacciones/uniones inespecíficas entre los

cebadores, de manera que en algunos estudios se observa una disminución de 0.5Cts- a 1 Ct cuando se utiliza esta variante a cuando no (Tang *et al.*, 2006)(Varkonyi-Gasic and Hellens, 2011)(Varkonyi-Gasic *et al.*, 2007)(Yi *et al.*, 2013). En nuestro caso, los valores de Ct no variaron al utilizar esta variante de RT pulsátil respecto al protocolo de RT recomendado por Roche y que se aplicó durante todo el estudio. Una alternativa para evitar la formación de productos inespecíficos es la PCR *touchdown*, la cual se caracteriza por la disminución gradual de la Ta (desde Ta más restrictivas a Ta más permisivas). Se empieza con una Ta de 5-10°C por encima de la Tm de los cebadores. En los siguientes ciclos la Ta disminuye de 1–2°C por ciclo hasta que se alcanza una temperatura de 2-5°C la Tm de los cebadores (Korbie and Mattick, 2008). Se trata de un método que mejora la especificidad del ensayo de PCR. Sin embargo, al utilizar este método, los valores de Ct de los miARNs fueron más altos, siendo cercanos al LOD, por lo que se tuvo que descartar el uso de esta variante de PCR.

Varios estudios y kits (solo para uso de investigación) basados en RT-qPCR utilizan hasta 3 *spike-ins*. Uno para monitorizar el proceso de extracción, un segundo, para evaluar la eficiencia de la síntesis de cADN y la presencia de inhibidores en la RT, y, un tercero para monitorizar la eficiencia de la PCR (Blondal *et al.*, 2013)(*osteomiR TM kit Wet Lab Instruction Manual v3.0 microRNA Biomarkers of Bone Quality TM*, 2020). En este estudio se usó el Cel-miR-39 para evaluar la extracción, así como controles positivos de cada uno de los miARNs (oligos mímicos), que se sometieron al mismo proceso de RT-qPCR, y sirvieron para controlar la calidad del proceso de cuantificación. Aunque el uso de muestras que contienen el miARN de interés se suelen utilizar como control positivo en los estudios de miARNs, resulta difícil encontrar una muestra biológica que actúe como control positivo de varios miARNs, por ello, también se recurre al uso de miARNs sintéticos, como es nuestro caso (Abdel Nour and Plaffl, 2020).

El método de qPCR debe contar con controles correctos para evaluar la calidad y fiabilidad de los datos producidos. La naturaleza del control debe reflejar las muestras de ensayo. Hay varios ejemplos de controles apropiados: NTC, control de extracción, control positivo, control positivo interno, etc. Los controles se someten a los mismos procesos de extracción y preparación que las muestras analizadas. Cuando proceda, la pureza de la secuencia de ácidos nucleicos de los materiales para preparar los controles positivos debe verificarse mediante secuenciación profunda. En el caso de los materiales de control positivo que se utilicen para la calibración, se especificará el método con el que se hayan asignado los valores de cantidad (ISO, 2019). En definitiva, los controles son un requisito imprescindible para cualquier ensayo de diagnóstico (Smith, 2021).

Ya en lo que respecta a la configuración y diseño del kit cabe tener en cuenta algunas limitaciones. Por un lado, a pesar de que, como se ha discutido al principio de este apartado, se llevó a cabo un estudio exhaustivo del efecto de la hemólisis en los miARNs candidatos a conformar el kit ScoliPro® utilizando distintos indicadores de hemólisis, esto es absorbancia y cálculo de ΔCt (Blondal *et al.*, 2013), solamente, se implantó como criterio de entrada de las muestras el valor de absorbancia de la oxihemoglobina. Sin embargo, el kit no incluye el análisis por RT-qPCR de la expresión de los miARNs miR-23a y miR-451a para evaluar el grado de hemólisis. No obstante, los resultados obtenidos del estudio de hemólisis controlada *in vitro* mostraron que, aunque, el cálculo del miR ratio es un método más sensible para la detección de la hemólisis en muestras de plasma que la medición de absorbancia, ambos sistemas de

detección pueden ser equiparables, abriendo la posibilidad de utilizar solamente uno de ellos, o el más sencillo, en este caso la medición de la absorbancia. El tener el proceso de muestreo bien definido y optimizado permitió que todas las muestras incluidas en el ensayo de funcionamiento del kit ScoliPro® tuviesen un valor de absorbancia a 414nm por debajo de 0.2, lo que indicó que las muestras fueron óptimas para su análisis. Incluir los miARNs de hemólisis en el kit no solo supone un aumento del coste de reactivos sino también, la optimización de las condiciones de RT-qPCR con los cebadores y sonda específicos para estos miARNs, que, como se ha comentado anteriormente es todo un desafío. Y que, además, para facilitar la preparación de las master mix, así como el proceso de fabricación, las condiciones de estos dos miARNs deberían de ajustarse a las condiciones ya definidas para el resto. Sin embargo en algunos kits como OsteomiR™ y thrombomiR™, aunque solo utilizados para fines de investigación, sí se incluye el análisis por RT-qPCR de estos dos miARNs para evaluar el índice de hemólisis en las muestras estudio (*osteomiR™ kit Wet Lab Instruction Manual v3.0 microRNA Biomarkers of Bone Quality™*, 2020)(*thrombomiR™ kit Wet Lab Instruction Manual v3.0 microRNA Biomarkers of Platelet Function stability for life*, 2020). Otra de las limitaciones fue no realizar multiplexado en la RT, lo cual obliga a que se necesite un volumen mayor de ARN para evaluar los 5 miARNs. Incluir esta variante implica una serie de experimentos de optimización y de validación adicionales para corroborar que la sensibilidad y especificidad no se ven afectadas (Lewis, Samantha, 2017)(Lewis, Samantha, 2017)(Sigma-Aldrich, 2008)(Sigma-Aldrich, no date). Este es uno de los objetivos primordiales en los que se va a trabajar para la versión 2 del kit.

Como se ha podido ver, el proceso de optimización de una RT-qPCR es un proceso complicado. Además de ello hay que sumarle la complejidad de trabajar con muestras de plasma y miARNs, ya descrito a lo largo del texto. Todo ello, refleja que ya solo la optimización de la parte analítica supone todo un desafío. Es importante tener en mente el auge que tuvieron los miARNs, ya que en el período que abarca desde 2009 a 2015 el número de artículos de miARNs en biofluidos se duplicó cada año debido al gran interés en estas biomoléculas. Sin embargo, del año 2015 a 2019 solamente se observó un mero aumento del 3% en las publicaciones anuales. Probablemente el interés por los miARNs en biofluidos se estabilizó debido a la incertidumbre general asociada a las mediciones de miARN basadas en biofluidos (Chorley *et al.*, 2021).

A pesar de los avances realizados en la medición de los miARNs, estas moléculas no se emplean todavía de forma rutinaria como biomarcadores no invasivos. La figura 53 resume los principales problemas asociados al uso de miARNs como biomarcadores, discutidos ya a lo largo del texto. Por un lado, algunos factores técnicos pueden actuar como variable confusora por lo que es importante minimizarlos. Entre ellos cabe destacar la recolección y el almacenamiento de la muestra, así como el aislamiento y la medición de los miARNs y el análisis de los resultados. Por lo que respecta a las variables biológicas hay que considerar que los miARNs candidatos a biomarcadores tienen una expresión basal, en el caso de suero, que varía en suero desde 30 a 1000 veces (Cheng *et al.*, 2013). Esta variabilidad puede ser debida a varios procesos, entre los que se incluyen el mecanismo o mecanismos de liberación celular y la accesibilidad a biofluidos, así como las diferentes interacciones con macromoléculas dentro de los biofluidos, los cuales pueden afectar a la estabilidad de estos. Por ello es importante considerar la correcta interpretación biológica de los resultados ya que algunos miARNs son específicos de un tejido o célula de manera que se pueden utilizar como biomarcadores de daño o enfermedad en ese tejido. En otros casos, los miARNs pueden ser específicos de un proceso o ruta molecular por lo

que se pueden utilizar como biomarcadores de respuesta celular. Ambas situaciones influyen en la presencia de los miARNs en los biofluidos por lo que deben de ser comprendidos correctamente dichos procesos para que realmente se puedan utilizar como biomarcadores y, por tanto, la interpretación de los resultados sea la adecuada. Cabe tener en cuenta que la variabilidad técnica se puede minimizar realizando una planificación cuidadosa del procedimiento, utilizando procedimientos estandarizados y a través de la experiencia, mientras que la interpretación de estas mediciones está menos definida y podría ser necesario para utilizar un miARN como biomarcador una investigación centrada cuyo objetivo sea relacionar los resultados moleculares con el fenotipo (Chorley *et al.*, 2021).

En definitiva, es necesario más investigación en el campo de miARNs candidatos a biomarcadores con el objetivo de optimizar los procedimientos técnicos para reducir cualquier sesgo potencial antes de la determinación y/o su uso rutinario para diagnóstico, pronóstico y predicción (Chorley *et al.*, 2021).

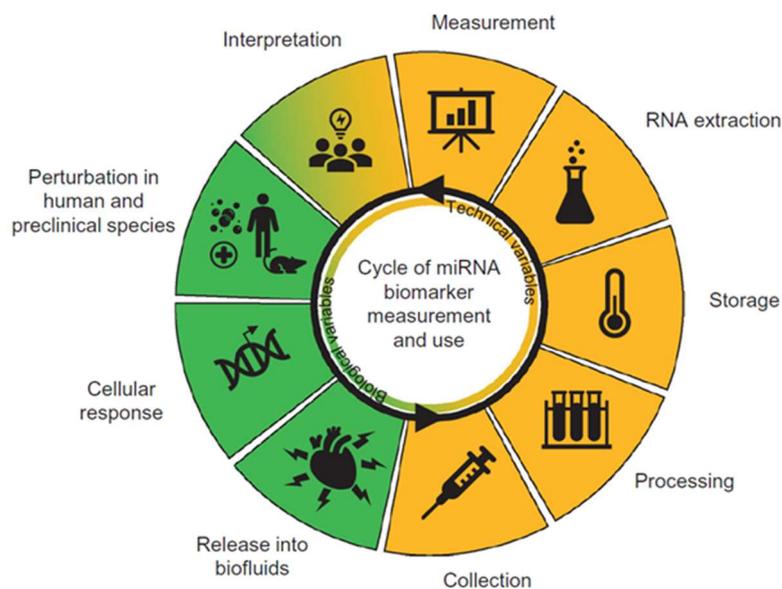


Figura 53. Desafíos asociados al desarrollo de miARNs como biomarcadores. Una serie de características técnicas (amarillo) y biológicas (verde) afectan al desarrollo de biomarcadores de miARNs de biofluidos. Cada cuadrante indica cada una de las consideraciones a tener en cuenta: recogida, procesamiento y almacenamiento de la muestra, extracción de miARNs, medición e interpretación, aplicación y comprensión biológica. En definitiva, el conocimiento de estos pasos retroalimenta el propósito principal de estos biomarcadores, que es evaluar los resultados adversos en humanos y especies modelo debido a toxicidad, enfermedad y otras perturbaciones. Cada uno de estos pasos supone todo un desafío y debe abordarse antes de establecer un miARN como biomarcador. Fuente: (Chorley *et al.*, 2021).

Además de la parte analítica, hay que tener en cuenta todo el proceso que implica el salto desde un estudio de investigación hasta el desarrollo de un kit IVD, para lo cual se ha de trabajar bajo normativas y legislación de aplicación. A pesar de que se ha realizado una importante inversión en el estudio de miARNs como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico, la adopción de estos ARNs más allá del descubrimiento y las aplicaciones científicas básicas no se ha realizado plenamente. Hoy en día no hay ningún miARN circulante aceptado por la FDA como biomarcador

en las categorías de riesgo, diagnóstico, monitorización, pronóstico, de predicción, de respuesta y de seguridad. Esto es debido al costoso y laborioso proceso de certificación, aunque iniciativas recientes como el Centro de Evaluación e Investigación de Medicamentos (CDER, *Center for Drug Evaluation and Research*), Programa de Calificación de Biomarcadores (BQP, *Biomarker Qualification Program*) y a la publicación de guías han proporcionado una vía para que este proceso se pueda desarrollar en un plazo de tiempo más corto (Chorley *et al.*, 2021).

En este trabajo, se exponen los resultados de la evaluación de funcionamiento analítico, quedando pendientes de finalizar el estudio de robustez, *trueness* y el estudio de estabilidad acelerada. Además, se muestran los resultados preliminares de funcionamiento clínico. Con todos estos datos se está generando la documentación necesaria para el proceso regulatorio que implica el desarrollo de un kit IVD.

En general, para los estudios *in house* se recomienda encarecidamente que se sigan las directrices globales de las MIQE (Smith, 2021). Sin embargo, estas guías son generales para la PCR. En la actualización de la MIQE del año 2021 se ha incorporado por primera vez un capítulo específico para miARNs, ya que se trata de biomoléculas identificadas hace poco tiempo. Ello muestra la dificultad de optimización de este estudio y el vacío que existe en algunos aspectos para la optimización de cuantificación de miARNs por RT-qPCR. Por ello, este trabajo se ha basado en la búsqueda de estas guías y la información se ha complementado y adaptado a la bibliografía publicada de estudio de miARNs.

Cabe tener en cuenta que una vez que se han cumplido las características de rendimiento del ensayo, ya sea comercial o test desarrollados en un laboratorio (LDT, *Laboratory Developed Test*), el ejercicio de validación debe continuar diariamente. Esto implica un seguimiento continuo de los niveles de los controles positivos internos y externos para garantizar el mantenimiento del estado de validación del ensayo. Por ello, el desarrollo de un kit no finaliza una vez haya salido al mercado, sino que supone un trabajo continuo (Smith, 2021).

Finalmente, con todo ello consideramos que esta Tesis Doctoral supone un avance en el establecimiento de los criterios básicos para el desarrollo de kits de diagnóstico *in vitro* basados en reacción de RT-qPCR para la medida de miARNs circulantes.

6. CONCLUSIONES

1. Se ha conseguido desarrollar el kit ScoliPro® basado en la técnica de RT-qPCR en la plataforma LightCycler 480II (Roche) propuesta como metodología para la cuantificación de los miARNs para el manejo clínico de la EIA.
2. Los miARNs miR-122-5p, miR-223-5p y miR-1306-3p no son sensibles a hemólisis. El miR-191-5p reveló ser un miARN ligeramente sensible a hemólisis, quedando patente la importancia del control y la protocolización de todas las variables preanalíticas incluyendo la toma de la muestra, transporte, procesamiento y el almacenamiento.
3. Se han optimizado las condiciones analíticas de RT-qPCR en la plataforma LightCycler 480II (Roche), observándose mayor sensibilidad en las curvas de calibrado preparadas a partir de cada uno de los oligos mímicos de los miARNs estudio, cuando se aplicó la estrategia de dilución del cADN de la RT (factor 1:10 con agua libre de ARNasas).
4. El análisis comparativo de las dos plataformas reveló mayor sensibilidad, valores de pendiente y eficiencia más cercanos a los óptimos en el equipo QuantStudio 5 de Thermo Fisher Scientific que con la plataforma LightCycler 480II (Roche).
5. Las condiciones de RT-qPCR determinadas como óptimas analíticamente en la plataforma LightCycler 480II (Roche) y extrapoladas a muestras reales de plasma de pacientes EIA permitieron cuantificar de forma satisfactoria los miARNs miR-122-5p, miR-223-5p, miR-1306-3p, miR-191-5p y Cel-miR-39.
6. Las condiciones de RT-qPCR determinadas como óptimas, el diseño y configuración del kit ScoliPro® permitieron diferenciar significativamente los niveles de expresión de los miARNs miR-122-5p y miR-1306-3p del grupo de pacientes EIA respecto al grupo control, validando la función diagnóstica de estos dos miARNs. En cuanto a la función pronóstica, las condiciones de RT-qPCR determinadas como óptimas, el diseño y configuración del kit ScoliPro® permitieron diferenciar significativamente los niveles de expresión del miR-1306-3p del grupo de pacientes EIA progresivos y no progresivos.
7. El miR-223-5p no puede ser incluido en el kit ScoliPro® como biomarcador de diagnóstico ni de pronóstico puesto que el comportamiento en los grupos de estudio a lo largo del seguimiento no resultó ser estable. En este sentido se hace necesario el aumento de la cohorte de estudio.
8. Se ha elaborado un flujograma que describe los pasos a seguir en la optimización de una RT-qPCR y los puntos de control a tener en cuenta que pueden ser aplicables a otros estudios de miARNs. Se ha definido, por tanto, la estrategia para el desarrollo de otros kits IVD basados en firma de miARNs a través de una metodología de optimización que se ha demostrado útil y reproducible.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abdel Nour, A. M. and Plaffl, M. W. (2020) *MIQE & qPCR: How to apply the MIQE Guidelines -a visual, interactive and practical qPCR guide!* 4th edn. Edited by A. M. Abdel Nour and M. W. Plaffl.

Abe, E., Yamamoto, M., Taguchi, Y., Lecka-Czernik, B., O'Brien, C. A., Economides, A. N., Stahl, N., Jilka, R. L. and Manolagas, S. C. (2000) Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin., *J Bone Miner Res.* 2000/04/26, 15(4), p.: 663–673.

Adachi, T., Nakanishi, M., Otsuka, Y., Nishimura, K., Hirokawa, G., Goto, Y., Nonogi, H. and Iwai, N. (2010) Plasma MicroRNA 499 as a Biomarker of Acute Myocardial Infarction., *Clinical Chemistry. Oxford Academic*, 56(7), p.: 1183–1185.

AEMPS, A. E. de M. y P. S. (2021) *Legislación sobre Productos sanitarios para diagnóstico in vitro.*

Agas, D., Sabbieti, M. G., Marchetti, L., Xiao, L. and Hurley, M. M. (2013) FGF-2 enhances Runx-2/Smads nuclear localization in BMP-2 canonical signaling in osteoblasts., *J Cell Physiol.* 2013/04/06, 228(11), p.: 2149–2158.

Alhasan, A. H., Kim, D. Y., Daniel, W. L., Watson, E., Meeks, J. J., Thaxton, C. S. and Mirkin, C. A. (2012) Scanometric MicroRNA array profiling of prostate cancer markers using spherical nucleic acid-gold nanoparticle conjugates., *Analytical Chemistry. NIH Public Access*, 84(9), p.: 4153–4160.

Allegra, A., Alonci, A., Campo, S., Penna, G., Petrongaro, A., Gerace, D. and Musolino, C. (2012) Circulating microRNAs: New biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (Review)., *International Journal of Oncology. Int J Oncol*, p.: 1897–1912.

Almeida, M., Han, L., Bellido, T., Manolagas, S. C. and Kousteni, S. (2005) Wnt proteins prevent apoptosis of both uncommitted osteoblast progenitors and differentiated osteoblasts by beta-catenin-dependent and -independent signaling cascades involving Src/ERK and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT., *J Biol Chem.* 2005/10/28, 280(50), p.: 41342–41351.

Altaf, F., Gibson, A., Dannawi, Z. and Noordeen, H. (2013) Adolescent idiopathic scoliosis., *BMJ.*

Amadix (2020) <https://amadix.com/colon-cancer/screening-test/>.

Andreasen, D., Fog, J. U., Biggs, W., Salomon, J., Dahlsveen, I. K., Baker, A. and Mouritzen, P. (2010) Improved microRNA quantification in total RNA from clinical samples., *Methods.*, p.: S6–9.

Androvic, P., Valihrach, L., Elling, J., Sjoback, R. and Kubista, M. (2017) Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification., *Nucleic acids research. Oxford University Press*, 45(15), p.: e144.

Appierto, V., Callari, M., Cavadini, E., Morelli, D., Daidone, M. G. and Tiberio, P. (2014) A lipemia-independent NanoDrop[®]-based score to identify hemolysis in plasma and serum samples., *Bioanalysis.*, 6(9), p.: 1215–1226.

applied biosystem (2005) *Product Guide. Taqman Gene Expression Assays Products.*

applied biosystem (2008) *Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR.*

applied biosystem (2019) *TaqMan Small RNA Assays. User Guide.*

Applied biosystem (2005) *TaqMan[®] MicroRNA Assays Protocol.*

Applied biosystem (no date) *Aspectos básicos de la PCR en tiempo real | Thermo Fisher Scientific*

- ES. Available at: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/essentials-real-time-pcr.html> (Accessed: 20 September 2021).

Arfat, Y., Xiao, W.-Z., Ahmad, M., Zhao, F., Li, D.-J., Sun, Y.-L., Hu, L., Zhihao, C., Zhang, G., Iftikhar, S., *et al.* (2015) Role of microRNAs in osteoblasts differentiation and bone disorders., *Current medicinal chemistry.*, 22(6), p.: 748–58.

Aulisa, L., Papaleo, P., Pola, E., Angelini, F., Aulisa, A. G., Tamburrelli, F. C., Pola, P. and Logroscino, C. A. (2007) Association Between IL-6 and MMP-3 Gene Polymorphisms and Adolescent Idiopathic Scoliosis., *Spine.*, 32(24), p.: 2700–2702.

Badri, A., Stefani, F. O. P., Lachance, G., Roy-Arcand, L., Beaudet, D., Vialle, A. and Hijri, M. (2016) Molecular diagnostic toolkit for *Rhizophagus irregularis* isolate DAOM-197198 using quantitative PCR assay targeting the mitochondrial genome., *Mycorrhiza. Springer Verlag*, 26(7), p.: 721–733.

Balcells, I., Cirera, S. and Busk, P. K. (2011) Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers., *BMC Biotechnology. BioMed Central*, 11(1), p.: 70.

Bao, H., Chen, Y., Huang, K., Zhuang, F., Bao, M., Han, Y., Chen, X., Shi, Q., Yao, Q. and Qi, Y. (2018) Platelet-derived microparticles promote endothelial cell proliferation in hypertension *via* miR-142–3p., *The FASEB Journal. FASEB*, 32(7), p.: 3912–3923.

Baron, R. and Kneissel, M. (2013) WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments., *Nat Med.* 2013/02/08, 19(2), p.: 179–192.

Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function., *Cell. Cell Press*, p.: 281–297.

Barwick, V., Morillas-Bravo, P. P., R Ellison, S. L., Engman, J., F Gjengedal, E. L., Lund, U. O., Magnusson, B., Müller, H.-T., Patriarca, M., Pohl, B., *et al.* (no date) *Guía Eurachem La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos Primera Edición Española Agradecimientos Grupo del proyecto.* Available at: www.eurachem.org (Accessed: 4 November 2020).

Beltrán-García, J., Osca-Verdegal, R., Mena-Mollá, S. and García-Giménez, J. L. (2019) Epigenetic IVD tests for personalized precision medicine in cancer., *Frontiers in Genetics. Frontiers Media S.A.*, p.: 621.

Bio-Rad (2006) *Real-Time PCR Applications Guide.*

Bird, A. (2007) Perceptions of epigenetics., *Nature* 2007 447:7143. Nature Publishing Group, 447(7143), p.: 396–398.

Blondal, T., Jensby Nielsen, S., Baker, A., Andreasen, D., Mouritzen, P., Wrang Teilum, M. and Dahlsveen, I. K. (2013) Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids., *Methods.*, 59(1), p.: S1–S6.

Boeckel, J.-N., Thomé, C. E., Leistner, D., Zeiher, A. M., Fichtlscherer, S. and Dimmeler, S. (2013) Heparin Selectively Affects the Quantification of MicroRNAs in Human Blood Samples., *Clinical Chemistry. Oxford Academic*, 59(7), p.: 1125–1127.

Boon, R. A. and Vickers, K. C. (2013) Intercellular transport of MicroRNAs., *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33(2), p.: 186–192.

Bryzgunova, O., Konoshenko, M., Zaporozhchenko, I., Yakovlev, A. and Laktionov, P. (2021) Isolation of cell-free mirna from biological fluids: Influencing factors and methods., *Diagnostics. MDPI AG*, p.: 865.

- Burns, M. and Valdivia, H. (2008) Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR., *European Food Research and Technology*. Springer, 226(6), p.: 1513–1524.
- Burton, M. S. (2013) Diagnosis and treatment of adolescent idiopathic scoliosis., *Pediatric annals*., 42(11), p.: 224–8.
- Burwell, R. G., Dangerfield, P. H., Moulton, A. and Grivas, T. B. (2011) Adolescent idiopathic scoliosis (AIS), environment, exposome and epigenetics: a molecular perspective of postnatal normal spinal growth and the etiopathogenesis of AIS with consideration of a network approach and possible implications for medical therapy., *Scoliosis*., 6(1), p.: 26.
- Bustin, S., Dhillon, H., Kirvell, S., Greenwood, C., Parker, M., Shipley, G. and Nolan, T. (2015) Variability of the reverse transcription step: practical implications., *Clinical chemistry. Clin Chem*, 61(1), p.: 202–212.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., *et al.* (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments., *Clinical chemistry. Clinical Chemistry*, 55(4), p.: 611–22.
- Bustin, S. A., Beaulieu, J. F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F. S. B., Olsvik, P. A., Penning, L. C. and Toegel, S. (2010) MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments., *BMC Molecular Biology*. BioMed Central, p.: 74.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., *et al.* (2011) Primer sequence disclosure: A clarification of the MIQE guidelines., *Clinical Chemistry. Clin Chem*, p.: 919–921.
- Bye, A., Røsjø, H., Nauman, J., Silva, G. J. J., Follestad, T., Omland, T. and Wisløff, U. (2016) Circulating microRNAs predict future fatal myocardial infarction in healthy individuals - The HUNT study., *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Academic Press, 97, p.: 162–168.
- Cao, Yaqin, Min, J., Zhang, Q., Li, Heng and Li, Haidong (2016) Associations of LBX1 gene and adolescent idiopathic scoliosis susceptibility: a meta-analysis based on 34,626 subjects., *BMC musculoskeletal disorders*. BioMed Central Ltd., 17(1), p.: 309.
- Cao, Y, Min, J., Zhang, Q., Li, H. and Li, H. (2016) Associations of LBX1 gene and adolescent idiopathic scoliosis susceptibility: a meta-analysis based on 34,626 subjects., *BMC Musculoskeletal Disord*., 17, p.: 309.
- Le Carré, J., Lamon, S. and Léger, B. (2014) Validation of a multiplex reverse transcription and pre-amplification method using TaqMan[®] MicroRNA assays., *Frontiers in Genetics*. Frontiers Media S.A., 5(NOV), p.: 413.
- Carreon, L. Y., Puno, R. M., Lenke, L. G., Richards, B. S., Sucato, D. J., Emans, J. B. and Erickson, M. A. (2007) Non-neurologic complications following surgery for adolescent idiopathic scoliosis., *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*. Journal of Bone and Joint Surgery Inc., 89(11), p.: 2427–2432.
- Carter OD, H. S. (1987) Prevalence rates for scoliosis in US adults: results from the first national health and nutrition examination survey., *Int J Epidemiol*., 16, p.: 537–544.
- Chang, K. H., Mestdagh, P., Vandesompele, J., Kerin, M. J. and Miller, N. (2010) MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer., *BMC Cancer*. BioMed Central, 10(1), p.: 173.

- 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., *et al.* (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR., *Nucleic Acids Research.*, 33(20), p.: e179–e179.
- Chen, C., Tan, H., Bi, J., Li, Z., Rong, T., Lin, Y., Sun, L., Li, X. and Shen, J. (2018) Identification of Competing Endogenous RNA Regulatory Networks in Vitamin A Deficiency-Induced Congenital Scoliosis by Transcriptome Sequencing Analysis., *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology.*, 48(5), p.: 2134–2146.
- Chen, G., Deng, C. and Li, Y.-P. (2012) TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation., *International Journal of Biological Sciences.*, 8(2), p.: 272–288.
- Chen, J., An, T., Ma, Y., Situ, B., Chen, D., Xu, Y., Zhang, L., Dai, Z. and Zou, X. (2018) Isothermal Amplification on a Structure-Switchable Symmetric Toehold Dumbbell-Template: A Strategy Enabling MicroRNA Analysis at the Single-Cell Level with Ultrahigh Specificity and Accuracy., *Analytical Chemistry. American Chemical Society*, 90(1), p.: 859–865.
- 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. and Pritchard, C. C. (2013) Plasma Processing Conditions Substantially Influence Circulating microRNA Biomarker Levels., *PLoS ONE*. Edited by S. Kiechl, 8(6), p.: e64795.
- Cheng, J. C., Castelein, R. M., Chu, W. C., Danielsson, A. J., Dobbs, M. B., Grivas, T. B., Gurnett, C. A., Luk, K. D., Moreau, A., Newton, P. O., *et al.* (2015) Adolescent idiopathic scoliosis., *Nat Rev Dis Primers.*, 1, p.: 15030.
- Cheng, Y., Zhang, X., Li, Z., Jiao, X., Wang, Y. and Zhang, Y. (2009) Highly sensitive determination of microRNA using target-primed and branched rolling-circle amplification., *Angewandte Chemie - International Edition. Angew Chem Int Ed Engl*, 48(18), p.: 3268–3272.
- Cheng, Y., Dong, L., Zhang, J., Zhao, Y. and Li, Z. (2018) Recent advances in microRNA detection., *Analyst. Royal Society of Chemistry*, p.: 1758–1774.
- Chettier, R., Nelson, L., Ogilvie, James W., Albertsen, H. M. and Ward, K. (2015) Haplotypes at LBX1 have distinct inheritance patterns with opposite effects in adolescent idiopathic scoliosis., *PLoS ONE.*, 10(2), p.: e0117708.
- Chettier, R., Nelson, L., Ogilvie, James W., Albertsen, H. M. and Ward, K. (2015) Haplotypes at LBX1 have distinct inheritance patterns with opposite effects in adolescent idiopathic scoliosis., *PLoS ONE. Public Library of Science*, 10(2), p.: e0117708.
- Chorley, B., Atabakhsh, E., Doran, G., Gautier, J., Ellinger-Ziegelbauer, H., Jackson, D., Sharapova, T., Yuen, P., Church, R., Couttet, P., *et al.* (2021) Methodological considerations for measuring biofluid-based microRNA biomarkers., *Critical reviews in toxicology. Crit Rev Toxicol*, 51(3), p.: 264–282.
- Cobb, J. R. (1948) Outline for the Study of Scoliosis., *Instructional Course Lectures. The American Academy of Orthopaedics Surgeons.*, 5, p.: 261-275.
- Cook, S., Asher, M., Lai, S. M. and Shobe, J. (2000) Reoperation after primary posterior instrumentation and fusion for idiopathic scoliosis: Toward defining late operative site pain of unknown cause., *Spine.*, 25(4), p.: 463–468.
- Coulter, B. (2012) for In Vitro Diagnostic Use Instructions for Use., 2018(February), p.: 1–38.
- Cowell, H. R., Hall, J. N. and MacEwen, G. D. (1973) Genetic aspects of idiopathic scoliosis., *Develop. Med. Child Neurol.*, 15, p.: 809–821.

Czimmerer, Z., Hulvely, J., Simandi, Z., Varallyay, E., Havelda, Z., Szabo, E., Varga, A., Dezso, B., Balogh, M., Horvath, A., *et al.* (2013) A Versatile Method to Design Stem-Loop Primer-Based Quantitative PCR Assays for Detecting Small Regulatory RNA Molecules., *PLoS ONE.*, 8(1).

Dellett, M. and Simpson, D. A. (2016) Considerations for optimization of microRNA PCR assays for molecular diagnosis.

Deng, R., Tang, L., Tian, Q., Wang, Y., Lin, L. and Li, J. (2014) Toehold-initiated rolling circle amplification for visualizing individual microRNAs in situ in single cells., *Angewandte Chemie - International Edition. Angew Chem Int Ed Engl*, 53(9), p.: 2389–2393.

Deschênes, S., Charron, G., Beaudoin, G., Labelle, H., Dubois, J., Miron, M. C. and Parent, S. (2010) Diagnostic imaging of spinal deformities: Reducing patients radiation dose with a new slot-scanning X-ray imager., *Spine. Spine (Phila Pa 1976)*, 35(9), p.: 989–994.

Deurloo, J. A. and Verkerk, P. H. (2015) To screen or not to screen for adolescent idiopathic scoliosis? A review of the literature., *Public Health.*, 129(9), p.: 1267–1272.

Diefenbach, C., Lonner, B. S., Auerbach, J. D., Bharucha, N. and Dean, L. E. (2013) Is radiation-free diagnostic monitoring of adolescent idiopathic scoliosis feasible using upright positional magnetic resonance imaging?., *Spine. Spine (Phila Pa 1976)*, 38(7), p.: 576–580.

Ding, X., Ding, J., Ning, J., Yi, F., Chen, J., Zhao, D., Zheng, J., Liang, Z., Hu, Z. and Du, Q. (2012) Circulating microRNA-122 as a potential biomarker for liver injury., *Molecular medicine reports. Mol Med Rep*, 5(6), p.: 1428–1432.

Donzelli, S., Zaina, F., Lusini, M., Minnella, S. and Negrini, S. (2014) In favour of the definition ‘adolescents with idiopathic scoliosis’: Juvenile and adolescent idiopathic scoliosis braced after ten years of age, do not show different end results. SOSORT award winner 2014., *Scoliosis. BioMed Central Ltd.*, 9(1), p.: 7.

Droplet Digital™ PCR Droplet Digital™ PCR Applications Guide (no date). Available at: https://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf (Accessed: 25 June 2021).

Duncan, L., Shen, H., Gelaye, B., Meijssen, J., Ressler, K., Feldman, M., Peterson, R. and Domingue, B. (2019) Analysis of polygenic risk score usage and performance in diverse human populations., *Nature Communications. Nature Publishing Group*, 10(1), p.: 1–9.

Dunn, J., Henrikson, N., Morrison, C., Nguyen, M., Blasi, P. and Lin, J. (2018) Screening for Adolescent Idiopathic Scoliosis: A Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force., *AHRQ Publication No. 17-05230-EF-1.*, 156. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29638297> (Accessed: 28 December 2019).

Dunn, John, Henrikson, N. B., Morrison, C. C., Blasi, P. R., Nguyen, M. and Lin, J. S. (2018) Screening for adolescent idiopathic scoliosis evidence report and systematic review for the US preventive services task force., *JAMA - Journal of the American Medical Association.*, 319(2), p.: 173–187.

El-Khoury, V., Pierson, S., Kaoma, T., Bernardin, F. and Berchem, G. (2016) Assessing cellular and circulating miRNA recovery: The impact of the RNA isolation method and the quantity of input material., *Scientific Reports. Nature Publishing Group*, 6(1), p.: 1–14.

EXIQON (2015) *Biofluids Guidelines. Analyzing microRNAs in liquid biopsies.*

Express, P. (2009) *TaqMan® Universal Master Mix II Protocol Trademarks of Life Technologies Corporation and its affiliated companies: Applied Biosystems®, AB® (Design), ABI PRISM®,*

DNAZap.

Fadzan, M. and Bettany-Saltikov, J. (2017) Etiological Theories of Adolescent Idiopathic Scoliosis: Past and Present., *The Open Orthopaedics Journal*. Bentham Science Publishers Ltd., 11(Suppl-9, M3), p.: 1466–1489.

Fan, Y. H., Song, Y. Q., Chan, D., Takahashi, Y., Ikegawa, S., Matsumoto, M., Kou, I., Cheah, K. S. E., Sham, P., Cheung, K. M. C., *et al.* (2012) SNP rs11190870 near LBX1 is associated with adolescent idiopathic scoliosis in southern Chinese., *Journal of Human Genetics*. Nature Publishing Group, 57(4), p.: 244–246.

Faruq, O. and Vecchione, A. (2015) microRNA: Diagnostic perspective., *Frontiers in Medicine*. Frontiers Media S.A.

Fei, Y., Xiao, L., Doetschman, T., Coffin, D. J. and Hurley, M. M. (2011) Fibroblast growth factor 2 stimulation of osteoblast differentiation and bone formation is mediated by modulation of the Wnt signaling pathway., *J Biol Chem*. 2011/10/12, 286(47), p.: 40575–40583.

Feng, J., Wang, K., Liu, X., Chen, S. and Chen, J. (2009) The quantification of tomato microRNAs response to viral infection by stem-loop real-time RT-PCR., *Gene*. Elsevier, 437(1–2), p.: 14–21.

Ferracin, M. and Negrini, M. (2018) Quantification of circulating micrnas by droplet digital PCR., in *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., p.: 445–457.

Ferràs-Tarragó, J., Valencia, J. M. M., Belmar, P. R., Vergara, S. P., Gómez, P. J., Hermida, J. L. B., Hermida, P. B. and Hermida, T. B. (2019) Cobb angle measurement with a conventional convex echography probe and a smartphone., *European Spine Journal*. Springer Verlag, 28(9), p.: 1955–1961.

Fong, D. Y. T., Lee, C. F., Cheung, K. M. C., Cheng, J. C. Y., Ng, B. K. W., Lam, T. P., Mak, K. H., Yip, P. S. F. and Luk, K. D. K. (2010) A meta-analysis of the clinical effectiveness of school scoliosis screening., *Spine*. Spine (Phila Pa 1976), 35(10), p.: 1061–1071.

Forero, D. A., González-Giraldo, Y., Castro-Vega, L. J. and Barreto, G. E. (2019) qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs., *BioTechniques*., 67(4), p.: 192–199.

Fortunato, O., Boeri, M., Verri, C., Conte, D., Mensah, M., Suatoni, P., Pastorino, U. and Sozzi, G. (2014) Assessment of circulating micrnas in plasma of lung cancer patients., *Molecules*. Molecular Diversity Preservation International, 19(3), p.: 3038–3054.

G, J., AA, N., T, N., J, H. and S, B. (2014) Minimum information necessary for quantitative real-time PCR experiments., *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). *Methods Mol Biol*, 1160, p.: 4–17.

G, W., Y, Zhao and Y, Zheng (2014) MiR-122/Wnt/ β -catenin regulatory circuitry sustains glioma progression., *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. *Tumour Biol*, 35(9), p.: 8565–8572.

Gao, W., Peng, Y., Liang, G., Liang, A., Ye, W., Zhang, L., Sharma, S., Su, P. and Huang, D. (2013) Association between Common Variants near LBX1 and Adolescent Idiopathic Scoliosis Replicated in the Chinese Han Population., *PLoS ONE*., 8(1).

García-Giménez, J., Rubio-Belmar, P., Peiró-Chova, L., Hervás, D., González-Rodríguez, D., Ibañez-Cabellos, J., Bas-Hermida, P., Mena-Mollá, S., García-López, E., Pallardó, F., *et al.* (2018) Circulating miRNAs as diagnostic biomarkers for adolescent idiopathic scoliosis., *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 8(1), p.: 2646.

Garcia-Gimenez, J. L. (2015) *Epigenetic Biomarkers and Diagnostics*, Translational Epigenetics.

Academic Press.

García-Giménez, J. L., Seco-Cervera, M., Tollefsbol, T. O., Romá-Mateo, C., Peiró-Chova, L., Lapunzina, P. and Pallardó, F. V. (2017) Epigenetic biomarkers: Current strategies and future challenges for their use in the clinical laboratory., *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. Taylor and Francis Ltd, p.: 529–550.

García-Giménez, J. L., Rubio-Belmar, P. A., Peiró-Chova, L., Hervás, D., González-Rodríguez, D., Ibañez-Cabellos, J. S., Bas-Hermida, P., Mena-Mollá, S., García-López, E. M., Pallardó, F. V., *et al.* (2018) Circulating miRNAs as diagnostic biomarkers for adolescent idiopathic scoliosis., *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 8(1), p.: 2646.

Ge, J., Zhang, L. L., Liu, S. J., Yu, R. Q. and Chu, X. (2014) A highly sensitive target-primed rolling circle amplification (TPRCA) method for fluorescent in situ hybridization detection of microRNA in tumor cells., *Analytical Chemistry*. American Chemical Society, 86(3), p.: 1808–1815.

Ge, Q., Tian, F., Zhou, Y., Zhu, Y., Lu, J., Bai, Y. and Lu, Z. (2014) A universal linker-RT PCR based quantitative method for the detection of circulating miRNAs., *Analytical Methods*. Royal Society of Chemistry, 6(22), p.: 9101–9107.

Gee, H., Buffa, F., Camps, C., Ramachandran, A., Leek, R., Taylor, M., Patil, M., Sheldon, H., Betts, G., Homer, J., *et al.* (2011) The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis., *British journal of cancer*. Br J Cancer, 104(7), p.: 1168–1177.

Geoffrey Burwell, R., Dangerfield, P. H., Moulton, A. and Grivas, T. B. (2011) Adolescent idiopathic scoliosis (AIS), environment, exposome and epigenetics: a molecular perspective of postnatal normal spinal growth and the etiopathogenesis of AIS with consideration of a network approach and possible implications for medical therapy., *Scoliosis*., 6(1), p.: 26.

Geoffrey Burwell, R., Dangerfield, P. H., Moulton, A., Grivas, T. B. and Cheng, J. C. Y. (2013) Whither the etiopathogenesis (and scoliogeny) of adolescent idiopathic scoliosis? Incorporating presentations on scoliogeny at the 2012 IRSSD and SRS meetings., *Scoliosis*.

Giampietro, P. F. (2012) *Genetic Aspects of Congenital and Idiopathic Scoliosis*., Scientifica. Hindawi Limited, 2012.

Giampietro, P. F. (2015) SNPping away at the genetic basis of adolescent idiopathic scoliosis., *Annals of Translational Medicine*.

Ginsburg, G. S. and Phillips, K. A. (2018) Precision medicine: From science to value., *Health Affairs*. Project HOPE, 37(5), p.: 694–701.

Giraldez, M. D., Chevillet, J. R. and Tewari, M. (2018) Droplet digital PCR for absolute quantification of extracellular microRNAs in plasma and serum: Quantification of the cancer biomarker hsa-miR-141., in *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., p.: 459–474.

Glinge, C., Clauss, S., Boddum, K., Jabbari, R., Jabbari, J., Risgaard, B., Tomsits, P., Hildebrand, B., Kaèaèè, S., Wakili, R., *et al.* (2017a) Stability of circulating blood-based microRNAs-Pre-Analytic methodological considerations., *PLoS ONE*. Public Library of Science, 12(2).

Glinge, C., Clauss, S., Boddum, K., Jabbari, R., Jabbari, J., Risgaard, B., Tomsits, P., Hildebrand, B., Kaèaèè, S., Wakili, R., *et al.* (2017b) Stability of circulating blood-based microRNAs-Pre-Analytic methodological considerations., *PLoS ONE*. Public Library of Science, 12(2).

Glynn, C. (2014) Title microRNA-mediated intercellular communication in the primary breast tumour microenvironment. Available at: <http://hdl.handle.net/10379/4702> (Accessed: 9 July

2021).

Gong, Y., Xu, F., Zhang, L., Qian, Y., Chen, J., Huang, H. and Yu, Y. (2014) MicroRNA expression signature for Satb2-induced osteogenic differentiation in bone marrow stromal cells., *Mol Cell Biochem.* 2013/11/13, 387(1–2), p.: 227–239.

Grauers, A., Danielsson, A., Karlsson, M., Ohlin, A. and Gerdhem, P. (2013) Family history and its association to curve size and treatment in 1,463 patients with idiopathic scoliosis., *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society.*, 22(11), p.: 2421–6.

Grauers, A, Wang, J., Einarsdottir, E., Simony, A., Danielsson, A., Åkesson, K., Ohlin, A., Halldin, K., Grabowski, P., Tenne, M., *et al.* (2015) Candidate gene analysis and exome sequencing confirm LBX1 as a susceptibility gene for idiopathic scoliosis., *Spine Journal. Elsevier Inc.*, 15(10), p.: 2239–2246.

Grauers, Anna, Wang, J., Einarsdottir, E., Simony, A., Danielsson, A., Åkesson, K., Ohlin, A., Halldin, K., Grabowski, P., Tenne, M., *et al.* (2015) Candidate gene analysis and exome sequencing confirm LBX1 as a susceptibility gene for idiopathic scoliosis., *Spine Journal. Elsevier Inc.*, 15(10), p.: 2239–2246.

Grauers, A., Einarsdottir, E. and Gerdhem, P. (2016) Genetics and pathogenesis of idiopathic scoliosis., *Scoliosis and Spinal Disorders. BioMed Central Ltd.*

Grauers, A., Rahman, I. and Gerdhem, P. (2012) Heritability of scoliosis., *European Spine Journal.*, 21(6), p.: 1069–1074.

Grivas, T. B., Vasilidis, E., Mouzakis, V., Mihos, C. and Koufopoulos, G. (2006) Association between adolescent idiopathic scoliosis prevalence and age at menarche in different geographic latitudes., *Scoliosis.*, 1, p.: 9.

Grossman, D. C., Curry, S. J., Owens, D. K., Barry, M. J., Davidson, K. W., Doubeni, C. A., Epling, J. W., Kemper, A. R., Krist, A. H., Kurth, A. E., *et al.* (2018) Screening for Adolescent Idiopathic Scoliosis., *JAMA. American Medical Association*, 319(2), p.: 165.

Guía Eurachem. La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos. Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados (2016).

Hackl, M., Heilmeyer, U., Weilner, S. and Grillari, J. (2016) Circulating microRNAs as novel biomarkers for bone diseases – Complex signatures for multifactorial diseases?., *Molecular and Cellular Endocrinology. Elsevier Ireland Ltd*, 432, p.: 83–95.

Hacquebord, J. and Leopold, S. (2012) In brief: the Risser classification: a classic tool for the clinician treating adolescent idiopathic scoliosis. Available at: https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11999-012-2371-y.pdf&casa_token=be8JNrAdECMAAAAA:FBUXZOa9colCpWUSCDZh4scZZBySNCAKLRBzSyDzAyGximhhRrY9CJLMoD_dUTIDoT0mFZcx9UyIP4Qw (Accessed: 30 July 2018).

Hashimoto, Y., Zumwalt, T. J. and Goel, A. (2016) DNA methylation patterns as noninvasive biomarkers and targets of epigenetic therapies in colorectal cancer., *Epigenomics. Future Medicine Ltd.*, p.: 685–703.

Hayes, M., Gao, X., Yu, L. X., Paria, N., Henkelman, R. M., Wise, C. A. and Ciruna, B. (2014) ptk7 mutant zebrafish models of congenital and idiopathic scoliosis implicate dysregulated Wnt signalling in disease., *Nature Communications.*, 5(1), p.: 4777.

Heilmeier, U., Hackl, M., Skalicky, S., Weilner, S., Schroeder, F., Vierlinger, K., Patsch, J. M., Baum, T., Oberbauer, E., Lobach, I., *et al.* (2016) Serum miRNA Signatures Are Indicative of Skeletal Fractures in Postmenopausal Women With and Without Type 2 Diabetes and Influence Osteogenic and Adipogenic Differentiation of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells In Vitro., *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.*, 31(12), p.: 2173–2192.

Hines, T., Roland, S., Nguyen, D., Kennard, B., Richard, H., Hughes, C. W., McClintock, S. M., Ramo, B. and Herring, T. (2015) School scoliosis screenings: Family experiences and potential anxiety after orthopaedic referral., *Spine. Lippincott Williams and Wilkins*, 40(21), p.: E1135–E1143.

Honda, S. and Kirino, Y. (2015) Dumbbell-PCR: A method to quantify specific small RNA variants with a single nucleotide resolution at terminal sequences., *Nucleic Acids Research. Oxford University Press*, 43(12), p.: e77.

Hong, A., Jaswal, N., Westover, L., Parent, E. C., Moreau, M., Hedden, D. and Adeeb, S. (2017) Surface Topography Classification Trees for Assessing Severity and Monitoring Progression in Adolescent Idiopathic Scoliosis., *Spine. Lippincott Williams and Wilkins*, 42(13), p.: E781–E787.

Hue, E. S., Fortier, C. I., Laurent, A. M., Quesnelle, Y. F., Fortier, G. D., Legrand, L. J. and Pronost, S. L. (2016) Development and validation of a quantitative PCR method for equid herpesvirus-2 diagnostics in respiratory fluids., *Journal of Visualized Experiments. Journal of Visualized Experiments*, 2016(109).

Hufbauer, M., Lazić, D., Reinartz, M., Akgül, B., Pfister, H. and Weissenborn, S. J. (2011) Skin tumor formation in human papillomavirus 8 transgenic mice is associated with a deregulation of oncogenic miRNAs and their tumor suppressive targets., *Journal of Dermatological Science. Elsevier*, 64(1), p.: 7–15.

Hui, S., Yang, Y., Li, J., Li, N., Xu, P., Li, H., Zhang, Y., Wang, S., Lin, G., Li, S., *et al.* (2019) Differential miRNAs profile and bioinformatics analyses in bone marrow mesenchymal stem cells from adolescent idiopathic scoliosis patients., *Spine Journal. Elsevier Inc.*, 19(9), p.: 1584–1596.

Hunt, E. A., Broyles, D., Head, T. and Deo, S. K. (2015) MicroRNA Detection: Current Technology and Research Strategies., *Annual Review of Analytical Chemistry. Annual Reviews Inc.*, p.: 217–237.

Hunter, M. E., Dorazio, R. M., Butterfield, J. S. S., Meigs-Friend, G., Nico, L. G. and Ferrante, J. A. (2017) Detection limits of quantitative and digital PCR assays and their influence in presence-absence surveys of environmental DNA., *Molecular Ecology Resources. Blackwell Publishing Ltd*, 17(2), p.: 221–229.

ICH (1995) *ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. Available at: <http://www.emea.eu.int> (Accessed: 19 October 2020).

Ikegawa, S. (2016) Genomic study of adolescent idiopathic scoliosis in Japan., *Scoliosis Spinal Disord.*, 11, p.: 5.

Imperiale, T. F., Ransohoff, D. F., Itzkowitz, S. H., Levin, T. R., Lavin, P., Lidgard, G. P., Ahlquist, D. A. and Berger, B. M. (2014) Multitarget Stool DNA Testing for Colorectal-Cancer Screening., <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1311194>. *Massachusetts Medical Society*, 370(14), p.: 1287–1297.

Inoue, M., Minami, S., Nakata, Y., Kitahara, H., Otsuka, Y., Isobe, K., Takaso, M., Tokunaga, M., Nishikawa, S., Maruta, T., *et al.* (2002) Association between estrogen receptor gene

polymorphisms and curve severity of idiopathic scoliosis., *Spine.*, 27(21), p.: 2357–62.

ISO (2019) *INTERNATIONAL STANDARD Biotechnology — Requirements for evaluating the performance of of quantification methods for nucleic acid target sequences — qPCR and dPCR.*

Itokowa, T., Zhu, M. L., Troiano, N., Bian, J., Kawano, T. and Insogna, K. (2011) Osteoclasts lacking Rac2 have defective chemotaxis and resorptive activity., *Calcif Tissue Int.* 2010/11/27, 88(1), p.: 75–86.

Janusz, P., Kotwicka, M., Andrusiewicz, M., Czaprowski, D., Czubak, J. and Kotwicki, T. (2014) Estrogen receptors genes polymorphisms and age at menarche in idiopathic scoliosis., *BMC musculoskeletal disorders.*, 15, p.: 383.

Japan, S. (2004) *Stratagene USA and Canada Stratagene Europe Order: 00800-7000-7000 Technical Services: 00800-7400-7400 Introduction to Quantitative PCR Methods and Application Guide.* Available at: www.stratagene.com (Accessed: 28 May 2021).

Jia, H., Li, Z., Liu, C. and Cheng, Y. (2010) Ultrasensitive detection of microRNAs by exponential isothermal amplification., *Angewandte Chemie - International Edition. Angew Chem Int Ed Engl*, 49(32), p.: 5498–5501.

Jiang, H., Qiu, X., Dai, J., Yan, H., Zhu, Z., Qian, B. and Qiu, Y. (2013) Association of rs11190870 near LBX1 with adolescent idiopathic scoliosis susceptibility in a Han Chinese population., *European Spine Journal.*, 22(2), p.: 282–286.

Jiang, H., Yang, Q., Liu, Y., Guan, Y., Zhan, X., Xiao, Z. and Wei, Q. (2019) Association between ladybird homeobox 1 gene polymorphisms and adolescent idiopathic scoliosis: A MOOSE-compliant meta-analysis., *Medicine. NLM (Medline)*, 98(27), p.: e16314.

Jonstrup, S. P., Koch, J. and Kjems, J. (2006) A microRNA detection system based on padlock probes and rolling circle amplification., *RNA. RNA*, 12(9), p.: 1747–1752.

Jung, U., Jiang, X., Kaufmann, S. H. E. and Patzel, V. (2013) A universal TaqMan-based RT-PCR protocol for cost-efficient detection of small noncoding RNA., *RNA. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 19(12), p.: 1864–1873.

Jung, Y., Frisvold, D., Dogan, T., Dogan, M. and Philibert, R. (2021) Cost-utility analysis of an integrated genetic/epigenetic test for assessing risk for coronary heart disease., *Epigenomics. Future Medicine Ltd.*, 13(7), p.: 531–547.

Kamtsiuris, P., Atzpodien, K., Ellert, U., Schlack, R. and Schlaud, M. (2007) Prävalenz von somatischen Erkrankungen bei Kindern und Jugendlichen in Deutschland: Ergebnisse des Kinder- und Jugendgesundheits surveys (KiGGS)., *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz.*, 50(5–6), p.: 686–700.

Kang, K., Zhang, X., Liu, H., Wang, Z., Zhong, J., Huang, Z., Peng, X., Zeng, Y., Wang, Y., Yang, Y., *et al.* (2012) A Novel Real-Time PCR Assay of microRNAs Using S-Poly(T), a Specific Oligo(dT) Reverse Transcription Primer with Excellent Sensitivity and Specificity., *PLoS ONE. PLoS One*, 7(11).

Kang, Q., Song, W. X., Luo, Q., Tang, N., Luo, J., Luo, X., Chen, J., Bi, Y., He, B. C., Park, J. K., *et al.* (2009) A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells., *Stem Cells Dev.* 2008/07/12, 18(4), p.: 545–559.

Karsenty, G., Kronenberg, H. M. and Settembre, C. (2009) Genetic control of bone formation., *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009/07/07, 25, p.: 629–648.

Kaudewitz, D., Lee, R., Willeit, P., McGregor, R., Markus, H. S., Kiechl, S., Zampetaki, A., Robert, J., Storey, F., Keith, J., *et al.* (2013) 609 New Technologies, Diagnostic Tools and Drugs Impact of intravenous heparin on quantification of circulating microRNAs in patients with coronary artery disease.

Kaudewitz, D., Skroblin, P., Bender, L. H., Barwari, T., Willeit, P., Pechlaner, R., Sunderland, N. P., Willeit, K., Morton, A. C., Armstrong, P. C., *et al.* (2016) Association of MicroRNAs and YRNAs with platelet function., *Circulation Research*. Lippincott Williams and Wilkins, 118(3), p.: 420–432.

Kelnar, K., Peltier, H., Leatherbury, N., Stoudemire, J. and Bader, A. (2014) Quantification of therapeutic miRNA mimics in whole blood from nonhuman primates., *Analytical Chemistry*. *Anal Chem*, 86(3), p.: 1534–1542.

Kelnar, Kevin, Peltier, H. J., Leatherbury, N., Stoudemire, J. and Bader, A. G. (2014) Quantification of Therapeutic miRNA Mimics in Whole Blood from Nonhuman Primates.

Kern, S. E. (2012) Why your new cancer biomarker may never work: Recurrent patterns and remarkable diversity in biomarker failures., *Cancer Research*. *Cancer Res*, p.: 6097–6101.

Khanshour, Anas M, Kou, I., Fan, Y., Einarsdottir, E., Makki, N., Kidane, Y. H., Kere, J., Grauers, A., Johnson, T. A., Paria, N., *et al.* (2018) Genome-wide meta-analysis and replication studies in multiple ethnicities identify novel adolescent idiopathic scoliosis susceptibility loci., *Human molecular genetics*., 27(22), p.: 3986–3998.

Khanshour, Anas M., Kou, I., Fan, Y., Einarsdottir, E., Makki, N., Kidane, Y. H., Kere, J., Grauers, A., Johnson, T. A., Paria, N., *et al.* (2018) Genome-wide meta-analysis and replication studies in multiple ethnicities identify novel adolescent idiopathic scoliosis susceptibility loci., *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 27(22), p.: 3986–3998.

Kikanloo, S. R., Tarpada, S. P. and Cho, W. (2019) Etiology of adolescent idiopathic scoliosis: A literature review., *Asian Spine Journal*. Korean Society of Spine Surgery, 13(3), p.: 519–526.

Kim, H. J., Blanco, J. S. and Widmann, R. F. (2009) Update on the management of idiopathic scoliosis., *Current Opinion in Pediatrics*. *Curr Opin Pediatr*, p.: 55–64.

Kim, J. H., Park, S. Y., Jun, Y., Kim, J. Y. and Nam, J. S. (2017) Roles of Wnt target genes in the journey of cancer stem cells., *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG.

Kirschner, M. B., Kao, S. C., Edelman, J. J., Armstrong, N. J., Vallely, M. P., van Zandwijk, N. and Reid, G. (2011) Haemolysis during Sample Preparation Alters microRNA Content of Plasma., *PLoS ONE*. Edited by S. Pfeffer. Public Library of Science, 6(9), p.: e24145.

Kirschner, M. B., Edelman, J. J. B., Kao, S. C.-H., Vallely, M. P., van Zandwijk, N. and Reid, G. (2013) The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers., *Frontiers in Genetics*., 4.

Kocijan, R., Muschitz, C., Geiger, E., Skalicky, S., Baierl, A., Dormann, R., Plachel, F., Feichtinger, X., Heimel, P., Fahrleitner-Pammer, A., *et al.* (2016) Circulating microRNA Signatures in Patients With Idiopathic and Postmenopausal Osteoporosis and Fragility Fractures., *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*., 101(11), p.: 4125–4134.

Komori, T. (2006) Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors., *J Cell Biochem*. 2006/06/24, 99(5), p.: 1233–1239.

Konieczny, M. R., Senyurt, H. and Krauspe, R. (2013) Epidemiology of adolescent idiopathic scoliosis., *J Child Orthop*., 7(1), p.: 3–9.

Konieczny, M., Senyurt, H. and Krauspe, R. (2013) Epidemiology of adolescent idiopathic

scoliosis., *Journal of Children's Orthopaedics.*, p.: 3–9.

Korbie, D. J. and Mattick, J. S. (2008) Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification., *Nature Protocols.*, 3(9), p.: 1452–1456.

Kotwicki, T., Janusz, P., Andrusiewicz, M., Chmielewska, M. and Kotwicka, M. (2014) Estrogen Receptor 2 Gene Polymorphism in Idiopathic Scoliosis., *Spine.*, 39(26), p.: E1599–E1607.

Kou, I., Takahashi, Y., Johnson, T. A., Takahashi, A., Guo, L., Dai, J., Qiu, X., Sharma, S., Takimoto, A., Ogura, Y., *et al.* (2013) Genetic variants in GPR126 are associated with adolescent idiopathic scoliosis., *Nature genetics.*, 45(6), p.: 676–9.

Kou, I., Watanabe, K., Takahashi, Y., Momozawa, Y., Khanshour, A., Grauers, A., Zhou, H., Liu, G., Fan, Y., Takeda, K., *et al.* (2018) A multi-ethnic meta-analysis confirms the association of rs6570507 with adolescent idiopathic scoliosis., *Scientific reports.*, 8(1), p.: 11575.

Kou, I., Otomo, N., Takeda, K., Momozawa, Y., Lu, H., Kubo, M., Kamatani, Y., Ogura, Y., Takahashi, Y., Nakajima, M., *et al.* (2019) Genome-wide association study identifies 14 previously unreported susceptibility loci for adolescent idiopathic scoliosis in Japanese., *Nature communications.*, 10(1), p.: 3685.

Kouwenhoven, J. W. M. and Castelein, R. M. (2008) The pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis: review of the literature., *Spine. Spine (Phila Pa 1976)*, p.: 2898–2908.

Kralik, P. and Ricchi, M. (2017a) A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything., *Frontiers in microbiology. Frontiers Media SA*, 8, p.: 108.

Kralik, P. and Ricchi, M. (2017b) A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything., *Frontiers in microbiology. Frontiers Media SA*, 8, p.: 108.

Kramer, M. F. (2011) Stem-loop RT-qPCR for miRNAs., *Current protocols in molecular biology. NIH Public Access*, Chapter 15, p.: Unit 15.10.

Kristensen, L. S., Wojdacz, T. K., Thestrup, B. B., Wiuf, C., Hager, H. and Hansen, L. L. (2009) Quality assessment of DNA derived from up to 30 years old formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissue for PCR-based methylation analysis using SMART-MSP and MS-HRM., *BMC Cancer. BMC Cancer*, 9.

Kroh, E. M., Parkin, R. K., Mitchell, P. S. and Tewari, M. (no date) Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR).

Kulis, A., Goździalska, A., Drąg, J., Jaśkiewicz, J., Knapik-Czajka, M., Lipik, E. and Zarzycki, D. (2015) Participation of sex hormones in multifactorial pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis., *International Orthopaedics. Springer Verlag*, 39(6), p.: 1227–1236.

Kumar, K. R., Cowley, M. J. and Davis, R. L. (2019) Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies., *Seminars in Thrombosis and Hemostasis. Thieme Medical Publishers, Inc.*, 45(7), p.: 661–673.

Kumar, P., Johnston, B. H. and Kazakov, S. A. (2011) MiR-ID: A novel, circularization-based platform for detection of microRNAs., *RNA. RNA*, 17(2), p.: 365–380.

Kumar, S. and Reddy, P. H. (2016) Are circulating microRNAs peripheral biomarkers for Alzheimer's disease?, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease. Elsevier B.V.*, p.: 1617–1627.

Laamiri, N., Aouini, R., Marnissi, B., Ghram, A. and Hmila, I. (2018) A multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of four most common avian respiratory viruses., *Virology*. Academic Press Inc., 515, p.: 29–37.

Labelle, H., Richards, S. B., De Kleuver, M., Grivas, T. B., Luk, K. D. K., Wong, H. K., Thometz, J., Beauséjour, M., Turgeon, I. and Fong, D. Y. T. (2013) Screening for adolescent idiopathic scoliosis: an information statement by the scoliosis research society international task force., *Scoliosis*., 8, p.: 17.

Lao, K., Xu, N. L., Yeung, V., Chen, C., Livak, K. J. and Straus, N. A. (2006) Multiplexing RT-PCR for the detection of multiple miRNA species in small samples., *Biochemical and Biophysical Research Communications*. *Biochem Biophys Res Commun*, 343(1), p.: 85–89.

Laurent-Puig, P., Paget-Bailly, S., Vernerey, D., Vazart, C., Decaulne, V., Fontaine, K., Rousseau, F., Elliott, F., Quirke, P., Richman, S., *et al.* (2015) Evaluation of miR 31 3p as a biomarker of prognosis and panitumumab benefit in RAS -wt advanced colorectal cancer (aCRC): Analysis of patients (pts) from the PICCOLO trial. , *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology (ASCO), 33(15_suppl), p.: 3547–3547.

Laurent-Puig, P., Grisoni, M.-L., Heinemann, V., Bonnetain, F., Fontaine, K., Vazart, C., Decaulne, V., Rousseau, F., Courtieu, B., Liebaert, F., *et al.* (2016) MiR 31 3p as a predictive biomarker of cetuximab efficacy effect in metastatic colorectal cancer (mCRC) patients enrolled in FIRE-3 study., *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology (ASCO), 34(15_suppl), p.: 3516–3516.

Lee, C. F., Fong, D. Y. T., Cheung, K. M. C., Cheng, J. C. Y., Ng, B. K. W., Lam, T. P., Mak, K. H., Yip, P. S. F. and Luk, K. D. K. (2010) Costs of school scoliosis screening: A large, population-based study., *Spine*., 35(26), p.: 2266–2272.

Lee, J. J., Wedow, R., Okbay, A., Kong, E., Maghziyan, O., Zacher, M., Nguyen-Viet, T. A., Bowers, P., Sidorenko, J., Karlsson Linnér, R., *et al.* (2018) Gene discovery and polygenic prediction from a genome-wide association study of educational attainment in 1.1 million individuals., *Nature Genetics*. *Nature Research*, 50(8), p.: 1112–1121.

Levy, A. R., Goldberg, M. S., Mayo, N. E., Hanley, J. A. and Benoit, P. (1996) Reducing the lifetime risk of cancer from spinal radiographs among people with adolescent idiopathic scoliosis., *Spine*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 21(13), p.: 1540–1548.

Lewis, Samantha, P. C. (2017) qPCR: Guidelines for validating a multiplex assay.

Li, M., Shen, Y., Gao, Z., Fang, X., Xie, Y., Wang, C., Zhao, Y. and Zhu, X. (2011) Surgical Treatment of Adult Idiopathic Scoliosis: Long-term Clinical Radiographic Outcomes., *Orthopedics*., 34(3), p.: 180–180.

Li, W. and Ruan, K. (2009) MicroRNA detection by microarray., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. *Anal Bioanal Chem*, p.: 1117–1124.

Li, Y. L., Gao, S. J., Xu, H., Liu, Y., Li, H. L., Chen, X. Y., Ning, G. Z. and Feng, S. Q. (2018) The association of rs11190870 near LBX1 with the susceptibility and severity of AIS, a meta-analysis., *International Journal of Surgery*. Elsevier Ltd, p.: 193–200.

Lian, J. B., Stein, G. S., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Hassan, M. Q., Gaur, T. and Zhang, Y. (2012) MicroRNA control of bone formation and homeostasis., *Nat Rev Endocrinol*., 8(4), p.: 212–227.

LightCycler® 480 Probes Master. (2005).

Liu, C. G., Calin, G. A., Volinia, S. and Croce, C. M. (2008) MicroRNA expression profiling using

microarrays., *Nature Protocols*. Nature Publishing Group, 3(4), p.: 563–578.

Liu, G., Liu, S., Lin, M., Li, X., Chen, W., Zuo, Y., Liu, J., Niu, Y., Zhao, S., Long, B., *et al.* (2018) Genetic polymorphisms of GPR126 are functionally associated with PUMC classifications of adolescent idiopathic scoliosis in a Northern Han population., *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. Blackwell Publishing Inc., 22(3), p.: 1964–1971.

Liu, G., Liu, S., Li, X., Chen, J., Chen, W., Zuo, Y., Liu, J., Niu, Y., Lin, M., Zhao, S., *et al.* (2019) Genetic polymorphisms of PAX1 are functionally associated with different PUMC types of adolescent idiopathic scoliosis in a northern Chinese Han population., *Gene*. Elsevier B.V., 688, p.: 215–220.

Liu, G., Wang, L., Wang, X., Yan, Z., Yang, X., Lin, M., Liu, S., Zuo, Y., Niu, Y., Zhao, S., *et al.* (2019) Whole-Genome Methylation Analysis of Phenotype Discordant Monozygotic Twins Reveals Novel Epigenetic Perturbation Contributing to the Pathogenesis of Adolescent Idiopathic Scoliosis., *Frontiers in bioengineering and biotechnology*., 7, p.: 364.

Liu, H., Huang, X., Liu, X., Xiao, S., Zhang, Y., Xiang, T., Shen, X., Wang, G. and Sheng, B. (2014) miR-21 promotes human nucleus pulposus cell proliferation through PTEN/AKT signaling., *International journal of molecular sciences*., 15(3), p.: 4007–18.

Liu, J., Zhou, Y., Liu, S., Song, X., Yang, X., Fan, Y., Chen, W., Akdemir, Z. C., Yan, Z., Zuo, Y., *et al.* (2018) The coexistence of copy number variations (CNVs) and single nucleotide polymorphisms (SNPs) at a locus can result in distorted calculations of the significance in associating SNPs to disease DISCO (Deciphering disorders Involving Scoliosis and COMorbidity), *Hum Genet.*, 137(7), p.: 553–567.

Liu, K., Tong, H., Li, T., Wang, X. and Chen, Y. (2020) Research progress in molecular biology related quantitative methods of MicroRNA., *American Journal of Translational Research*. E-Century Publishing Corporation, p.: 3198–3211. Available at: www.ajtr.org (Accessed: 14 June 2021).

Liu, X. Y., Wang, L., Yu, B., Zhuang, Q. Y. and Wang, Y. P. (2015) Expression Signatures of Long Noncoding RNAs in Adolescent Idiopathic Scoliosis., *Biomed Res Int.*, 2015, p.: 276049.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method., *Methods*. Academic Press Inc., 25(4), p.: 402–408.

Londono, D, Kou, I., Johnson, T. A., Sharma, S., Ogura, Y., Tsunoda, T., Takahashi, A., Matsumoto, M., Herring, J. A., Lam, T. P., *et al.* (2014) A meta-analysis identifies adolescent idiopathic scoliosis association with LBX1 locus in multiple ethnic groups., *J Med Genet.*, 51(6), p.: 401–406.

Londono, Douglas, Kou, I., Johnson, T. A., Sharma, S., Ogura, Y., Tsunoda, T., Takahashi, A., Matsumoto, M., Herring, J. A., Lam, T. P., *et al.* (2014) A meta-analysis identifies adolescent idiopathic scoliosis association with LBX1 locus in multiple ethnic groups., *Journal of Medical Genetics*. BMJ Publishing Group, 51(6), p.: 401–406.

Lonstein, J. E., D4, M., Carlson, J. M. and Paul, S. T. (1984) *The Prediction of Curve Progression in Untreated Idiopathic Scoliosis during Growth**, *The Journal of Bone and Joint Surgery*. incorporated. Available at: www.ejbs.org (Accessed: 27 May 2021).

Lorenz, T. C. (2012) Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies., *Journal of Visualized Experiments*. MyJoVE Corporation, 63(63), p.: 3998.

Lowe, T. G., Edgar, M., Margulies, J. Y., Miller, N. H., Raso, V. J., Reinker, K. A. and Rivard, C. H.

(2000) Etiology of idiopathic scoliosis: Current trends in research., *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A. Journal of Bone and Joint Surgery Inc.*, p.: 1157–1168.

LS, H., L, I., BK, P. and CE, G. (2018) MiR-122 and other microRNAs as potential circulating biomarkers of drug-induced liver injury., *Expert review of molecular diagnostics. Expert Rev Mol Diagn*, 18(1), p.: 47–54.

Ma, J., Li, N., Guarnera, M. and Jiang, F. (2013) Quantification of Plasma miRNAs by Digital PCR for Cancer Diagnosis., *Biomarker insights.*, 8, p.: 127–36.

MacLellan, S. A., MacAulay, C., Lam, S. and Garnis, C. (2014) Pre-profiling factors influencing serum microRNA levels., *BMC clinical pathology. BioMed Central*, 14, p.: 27.

Man, G. C. W., Tang, N. L. S., Chan, T. F., Lam, T. P., Li, J. W., Ng, B. K. W., Zhu, Z., Qiu, Y. and Cheng, J. C. Y. (2019) Replication Study for the Association of GWAS-associated Loci with Adolescent Idiopathic Scoliosis Susceptibility and Curve Progression in a Chinese Population., *Spine. Lippincott Williams and Wilkins*, 44(7), p.: 464–471.

Manceau, G., Imbeaud, S., Thiébaud, R., Liébaert, F., Fontaine, K., Rousseau, F., Génin, B., Le Corre, D., Didelot, A., Vincent, M., *et al.* (2014) Hsa-miR-31-3p expression is linked to progression-free survival in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy., *Clinical Cancer Research. American Association for Cancer Research Inc.*, 20(12), p.: 3338–3347.

Mao, S.-H., Qian, B.-P., Shi, B., Zhu, Z.-Z. and Qiu, Y. (2018) Quantitative evaluation of the relationship between COMP promoter methylation and the susceptibility and curve progression of adolescent idiopathic scoliosis., *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society.*, 27(2), p.: 272–277.

Marabita, F., de Candia, P., Torri, A., Tegnér, J., Abrignani, S. and Rossi, R. L. (2016) Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR., *Briefings in bioinformatics. Oxford University Press*, 17(2), p.: 204–12.

Marosy, B., Justice, C. M., Vu, C., Zorn, A., Nzegwu, N., Wilson, A. F. and Miller, N. H. (2010) Identification of susceptibility loci for scoliosis in FIS families with triple curves., *American Journal of Medical Genetics Part A.*, 152A(4), p.: 846–855.

Maués, J. H. da S., Moreira-Nunes, C. de F. A. and Burbano, R. M. R. (2020) Computational Identification and Characterization of New microRNAs in Human Platelets Stored in a Blood Bank., *Biomolecules. MDPI AG*, 10(8), p.: 1173.

Mayr, M., Zampetaki, A., Willeit, P., Willeit, J. and Kiechl, S. (2013) MicroRNAs within the continuum of postgenomics biomarker discovery., *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33(2), p.: 206–214.

McDonald, J. S., Milosevic, D., Reddi, H. V, Grebe, S. K. and Algeciras-Schimnich, A. (2011) Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges., *Clinical chemistry.*, 57(6), p.: 833–40.

McKenna, C., Wade, R., Faria, R., Yang, H., Stirk, L., Gummerson, N., Sculpher, M. and Woolacott, N. (2012) EOS 2D/3D X-ray imaging system: A systematic review and economic evaluation., *Health Technology Assessment. NIHR Journals Library*.

Meerson, A. and Ploug, T. (2016) Assessment of six commercial plasma small RNA isolation kits using qRT-PCR and electrophoretic separation: higher recovery of microRNA following ultracentrifugation., *Biology Methods and Protocols. Oxford University Press*, 1(1).

- Mei, Q., Li, X., Meng, Y., Wu, Z., Guo, M., Zhao, Y., Fu, X. and Han, W. (2012) A Facile and Specific Assay for Quantifying MicroRNA by an Optimized RT-qPCR Approach., *PLoS ONE*. Edited by P. Gonzalez. Public Library of Science, 7(10), p.: e46890.
- Meng, Y., Lin, T., Liang, S., Gao, R., Jiang, H., Shao, W., Yang, F. and Zhou, X. (2018) Value of DNA methylation in predicting curve progression in patients with adolescent idiopathic scoliosis., *EBioMedicine*. The Authors, 36, p.: 489–496.
- Menger, R. P., Kalakoti, P., Pugely, A. J., Nanda, A. and Sin, A. (2017) Adolescent idiopathic scoliosis: Risk factors for complications and the effect of hospital volume on outcomes., *Neurosurgical Focus.*, 43(4), p.: 1–13.
- Mercer, T. R., Dinger, M. E. and Mattick, J. S. (2009) Long non-coding RNAs: Insights into functions., *Nature Reviews Genetics.*, 10(3), p.: 155–159.
- Mestdagh, P., Van Vlierberghe, P., De Weer, A., Muth, D., Westermann, F., Speleman, F. and Vandesompele, J. (2009) A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization., *Genome biology*. BioMed Central, 10(6), p.: R64.
- Mikeska, T. and Dobrovic, A. (2009) Validation of a primer optimisation matrix to improve the performance of reverse transcription - Quantitative real-time PCR assays., *BMC Research Notes*. BioMed Central, 2(1), p.: 1–5.
- Minehiro, K., Demura, S., Ichikawa, K., Sasagawa, T., Takahashi, N., Minami, S., Murakami, H. and Tsuchiya, H. (2019) Dose Reduction Protocol for Full Spine X-ray Examination Using Copper Filters in Patients with Adolescent Idiopathic Scoliosis., *Spine*. Lippincott Williams and Wilkins, 44(3), p.: 203–210.
- 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., *et al.* (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 105(30), p.: 10513–8.
- Miyake, A., Kou, I., Takahashi, Y., Johnson, T. A., Ogura, Y., Dai, J., Qiu, X., Takahashi, A., Jiang, H., Yan, H., *et al.* (2013) Identification of a Susceptibility Locus for Severe Adolescent Idiopathic Scoliosis on Chromosome 17q24.3., *PLoS ONE.*, 8(9).
- Mizuhara, E., Nakatani, T., Minaki, Y., Sakamoto, Y., Ono, Y. and Takai, Y. (2005) MAGI1 Recruits Dll1 to Cadherin-based Adherens Junctions and Stabilizes It on the Cell Surface.
- Moldovan, L., Batte, K. E., Trgovcich, J., Wisler, J., Marsh, C. B. and Piper, M. (2014) Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers., *Journal of cellular and molecular medicine*. Wiley-Blackwell, 18(3), p.: 371–90.
- Mompeón, A., Ortega-Paz, L., Vidal-Gómez, X., Costa, T. J., Pérez-Cremades, D., Garcia-Blas, S., Brugaletta, S., Sanchis, J., Sabate, M., Novella, S., *et al.* (2020) Disparate miRNA expression in serum and plasma of patients with acute myocardial infarction: a systematic and paired comparative analysis., *Scientific Reports*. Nature Research, 10(1), p.: 1–11.
- Moon, E. S., Kim, H. S., Sharma, V., Park, J. O., Lee, H. M., Moon, S. H. and Chong, H. S. (2013) Analysis of single nucleotide polymorphism in adolescent idiopathic scoliosis in Korea: For personalized treatment., *Yonsei Medical Journal.*, 54(2), p.: 500–509.
- Morel, B., Moueddeb, S., Blondiaux, E., Richard, S., Bachy, M., Vialle, R. and Ducou Le Pointe, H. (2018) Dose, image quality and spine modeling assessment of biplanar EOS micro-dose radiographs for the follow-up of in-brace adolescent idiopathic scoliosis patients., *European Spine Journal*. Springer Verlag, 27(5), p.: 1082–1088.

Morin Doody, M., Lonstein, J. E., Stovall, M., Hacker, D. G., Luckyanov, N. and Land, C. E. (2000) Breast cancer mortality after diagnostic radiography: Findings from the U.S. scoliosis cohort study., *Spine*. *Spine (Phila Pa 1976)*, 25(16), p.: 2052–2063.

Murphy, J. and Bustin, S. A. (2009) Reliability of real-time reverse-transcription PCR in clinical diagnostics: Gold standard or substandard?., *Expert Review of Molecular Diagnostics*. *Expert Rev Mol Diagn*, p.: 187–197.

Murphy, R. F. and Mooney, J. F. (2016) Complications following spine fusion for adolescent idiopathic scoliosis., *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*. Humana Press Inc., p.: 462–469.

Murray, M. J., Bell, E., Raby, K. L., Rijlaarsdam, M. A., M Gillis, A. J., J Looijenga, L. H., Brown, H., Destenaves, B., Nicholson, J. C. and Coleman, N. (2015) A pipeline to quantify serum and cerebrospinal fluid microRNAs for diagnosis and detection of relapse in paediatric malignant germ-cell tumours., *British Journal of Cancer*., 114.

Murray, M. J., Watson, H. L., Ward, D., Bailey, S., Ferrareso, M., Nicholson, J. C., Gnanapragasam, V. J., Thomas, B., Scarpini, C. G. and Coleman, N. (2018) 'Future-Proofing' blood processing for measurement of circulating miRNAs in samples from biobanks and prospective clinical trials., *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. American Association for Cancer Research Inc., 27(2), p.: 208–218.

Mussbacher, M., Krammer, T. L., Heber, S., Schrottmaier, W. C., Zeibig, S., Holthoff, H. P., Pereyra, D., Starlinger, P., Hackl, M. and Assinger, A. (2020) Impact of Anticoagulation and Sample Processing on the Quantification of Human Blood-Derived microRNA Signatures., *Cells*. NLM (Medline), 9(8), p.: 1915.

Myklebust, M. P., Rosenlund, B., Gjengstø, P., Bercea, B. S., Karlsdottir, Á., Brydøy, M. and Dahl, O. (2019a) Quantitative PCR Measurement of miR-371a-3p and miR-372-p Is Influenced by Hemolysis., *Frontiers in Genetics*. Frontiers Media S.A., 10(MAY).

Myklebust, M. P., Rosenlund, B., Gjengstø, P., Bercea, B. S., Karlsdottir, Á., Brydøy, M. and Dahl, O. (2019b) Quantitative PCR Measurement of miR-371a-3p and miR-372-p Is Influenced by Hemolysis., *Frontiers in Genetics*. Frontiers Media S.A., 10(MAY), p.: 463.

Nachemson, A. L., Peterson, L. E., Bradford, D. S., Burwell, R. G., Duhaime, M., Edgar, M. A., Eppig, M. M., Gardner, A. D. H., Kehl, D. K., Lidstrom, J., *et al.* (1995) Effectiveness of treatment with a brace in girls who have adolescent idiopathic scoliosis. A prospective, controlled study based on data from the Brace Study of the Scoliosis Research Society., *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*. *Journal of Bone and Joint Surgery Inc.*, 77(6), p.: 815–822.

Nada, D., Julien, C., Samuels, M. E. and Moreau, A. (2018) A Replication Study for Association of LBX1 Locus With Adolescent Idiopathic Scoliosis in French-Canadian Population., *Spine*. Lippincott Williams and Wilkins, 43(3), p.: 172–178.

Van Ness, J., Van Ness, L. K. and Galas, D. J. (2003) Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(8), p.: 4504–4509.

Newton Ede, M. M. P. and Jones, S. W. (2016) Adolescent idiopathic scoliosis: evidence for intrinsic factors driving aetiology and progression., *International Orthopaedics*. Springer Verlag, p.: 2075–2080.

Newton, P. O., Khandwala, Y., Bartley, C. E., Reighard, F. G., Bastrom, T. P. and Yaszay, B. (2016) New EOS Imaging Protocol Allows a Substantial Reduction in Radiation Exposure for Scoliosis

Patients., Spine deformity. Elsevier Inc., 4(2), p.: 138–144.

Noshchenko, A., Hoffecker, L., Lindley, E. M., Burger, E. L., Cain, C. M. J. M., Patel, V. V. and Bradford, A. P. (2015) Predictors of spine deformity progression in adolescent idiopathic scoliosis: A systematic review with meta-analysis., World Journal of Orthopaedics. Baishideng Publishing Group Co, 6(7), p.: 537–558.

Ogilvie JW, Chettier R, Nelson LM, W. K. (2012) DNA-based prognostic test scores are higher in patients who fail orthotic treatment for adolescent idiopathic scoliosis., in Scoliosis Research Society 47rd Annual Meeting and Course., Chicago, Illinois, USA, p.: 159.

Ogura, Y., Takahashi, Y., Kou, I., Nakajima, M., Kono, K., Kawakami, N., Uno, K., Ito, M., Minami, S., Yanagida, H., *et al.* (2013) A replication study for association of 53 single nucleotide polymorphisms in a scoliosis prognostic test with progression of adolescent idiopathic scoliosis in Japanese., Spine., 38(16), p.: 1375–1379.

Ogura, Y., Kou, I., Miura, S., Takahashi, A., Xu, L., Takeda, K., Takahashi, Y., Kono, K., Kawakami, N., Uno, K., *et al.* (2015) A Functional SNP in BNC2 Is Associated with Adolescent Idiopathic Scoliosis., American Journal of Human Genetics. Cell Press, 97(2), p.: 337–342.

Ogura, Y., Kou, I., Takahashi, Y., Takeda, K., Minami, S., Kawakami, N., Uno, K., Ito, M., Yonezawa, I., Kaito, T., *et al.* (2017) A functional variant in MIR4300HG, the host gene of microRNA MIR4300 is associated with progression of adolescent idiopathic scoliosis., Human Molecular Genetics., 26(20), p.: 4086–4092.

Ogura, Yoji, Takeda, K., Kou, I., Khanshour, A., Grauers, A., Zhou, H., Liu, G., Fan, Y. H., Zhou, T., Wu, Z., *et al.* (2018) An international meta-analysis confirms the association of BNC2 with adolescent idiopathic scoliosis., Scientific Reports. Nature Publishing Group, 8(1).

Ogura, Y, Takeda, K., Kou, I., Khanshour, A., Grauers, A., Zhou, H., Liu, G., Fan, Y., Zhou, T., Wu, Z., *et al.* (2018) An international meta-analysis confirms the association of BNC2 with adolescent idiopathic scoliosis., Scientific Reports. Nature Publishing Group, 8(1).

Ogura, Yoji, Matsumoto, M., Ikegawa, S. and Watanabe, K. (2018) Epigenetics for curve progression of adolescent idiopathic scoliosis., EBioMedicine. The Authors, 37, p.: 36–37.

Oh, C. H., Kim, C. G., Lee, M. S., Yoon, S. H., Park, H. C. and Park, C. O. (2012) Usefulness of chest radiographs for scoliosis screening: a comparison with thoraco-lumbar standing radiographs., Yonsei Med J. 2012/10/18, 53(6), p.: 1183–1189.

Oliazadeh, N., Gorman, K. F., Eveleigh, R., Bourque, G. and Moreau, A. (2017) Identification of Elongated Primary Cilia with Impaired Mechanotransduction in Idiopathic Scoliosis Patients., Scientific Reports., 7(1), p.: 44260.

Osman, A. and FÄlker, K. (2011) Characterization of human platelet microRNA by quantitative PCR coupled with an annotation network for predicted target genes., Platelets. Platelets, 22(6), p.: 433–441.

osteomiR TM kit Wet Lab Instruction Manual v3.0 microRNA Biomarkers of Bone Quality TM (2020). Available at: www.tamirna.com/osteomir (Accessed: 4 November 2020).

Ouyang, T., Liu, Z., Han, Z. and Ge, Q. (2019) MicroRNA Detection Specificity: Recent Advances and Future Perspective., Analytical Chemistry. American Chemical Society, p.: 3179–3186.

Pan, Y., Liang, H., Liu, H., Li, D., Chen, X., Li, L., Zhang, C.-Y. and Zen, K. (2014) Platelet-Secreted MicroRNA-223 Promotes Endothelial Cell Apoptosis Induced by Advanced Glycation End Products via Targeting the Insulin-like Growth Factor 1 Receptor., The Journal of Immunology.

The American Association of Immunologists, 192(1), p.: 437–446.

Panach, L., Damián Mifsut, B., Juan Tarín, B. J., Antonio Cano, B. and Miguel Angel García-Pérez, B. (2015) Serum Circulating MicroRNAs as Biomarkers of Osteoporotic Fracture., *Calcified Tissue International.*, 97, p.: 495–505.

Park, W. W., Suh, K. T., Kim, J. Il, Kim, S. J. and Lee, J. S. (2009) Decreased osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and reduced bone mineral density in patients with adolescent idiopathic scoliosis., *European Spine Journal.*, 18(12), p.: 1920–1926.

Peng, Y., Wang, S. R., Qiu, G. X., Zhang, J. G., Zhuang, Q. Y. and Wang, N. N. (2020) Research progress on the etiology and pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis., *Chinese Medical Journal.* Lippincott Williams and Wilkins, p.: 483–493.

Penolazzi, L., Lambertini, E., Bergamin, L. S., Roncada, T., De Bonis, P., Cavallo, M. and Piva, R. (2018) MicroRNA-221 silencing attenuates the degenerated phenotype of intervertebral disc cells., *Aging.*, 10(8), p.: 2001–2015.

Pérez-Machado, G., Berenguer-Pascual, E., Bovea-Marco, M., Rubio-Belmar, P. A., García-López, E., Garzón, M. J., Mena-Mollá, S., Pallardó, F. V., Bas, T., Viña, J. R., *et al.* (2020) From genetics to epigenetics to unravel the etiology of adolescent idiopathic scoliosis., *Bone.* Elsevier Inc.

Pizzamiglio, S., Zanutto, S., Ciniselli, C. M., Belfiore, A., Bottelli, S., Gariboldi, M. and Verderio, P. (2017) A methodological procedure for evaluating the impact of hemolysis on circulating microRNAs., *Oncology letters.* Spandidos Publications, 13(1), p.: 315–320.

De Planell-Saguer, M. and Rodicio, M. C. (2013) Detection methods for microRNAs in clinic practice., *Clinical Biochemistry.* Clin Biochem, p.: 869–878.

Poel, D., Buffart, T. E., Oosterling-Jansen, J., Verheul, H. M. and Voortman, J. (2018) Evaluation of several methodological challenges in circulating miRNA qPCR studies in patients with head and neck cancer., *Experimental & Molecular Medicine.* Nature Publishing Group, 50(3), p.: e454.

Pritchard, C. C., Kroh, E., Wood, B., Arroyo, J. D., Dougherty, K. J., Miyaji, M. M., Tait, J. F. and Tewari, M. (2012) Blood Cell Origin of Circulating MicroRNAs: A Cautionary Note for Cancer Biomarker Studies.

Punga, A. R., Andersson, M., Alimohammadi, M. and Punga, T. (2015) Disease specific signature of circulating miR-150-5p and miR-21-5p in myasthenia gravis patients., *Journal of the Neurological Sciences.* Elsevier B.V., 356(1–2), p.: 90–96.

Qin, X., Xu, L., Xia, C., Zhu, W., Sun, W., Liu, Z., Qiu, Y. and Zhu, Z. (2017) Genetic Variant of GPR126 Gene is Functionally Associated with Adolescent Idiopathic Scoliosis in Chinese Population., *Spine.* Lippincott Williams and Wilkins, 42(19), p.: E1098–E1103.

Rackowski, J. W. (2007) The concentrations of testosterone and estradiol in girls with adolescent idiopathic scoliosis., *Neuroendocrinology Letters.*, 28(3), p.: 302–304.

Ramon, L., David, C., Fontaine, K., Lallet, E., Marcaillou, C., Martin-Lannerée, S., Decaulne, V., Vazart, C., Gélibert, A.-H., Abdelali, R. Ben, *et al.* (2018) Technical Validation of a Reverse-Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction In Vitro Diagnostic Test for the Determination of MiR-31-3p Expression Levels in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Metastatic Colorectal Cancer Tumor Specimens., *Biomarker Insights.* SAGE Publications Sage UK: London, England, 13, p.: 117727191876335.

Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B. and Cartuyvels, R. (2009) Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays., *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* John Wiley & Sons,

Ltd, 23(3), p.: 145–151.

Redshaw, N., Wilkes, T., Whale, A., Cowen, S., Huggett, J. and Foy, C. A. (2013) A comparison of miRNA isolation and RT-qPCR technologies and their effects on quantification accuracy and repeatability., *BioTechniques.*, 54(3), p.: 155–164.

Ridley, M. (2009) *The Genetics and Development of Behavior*, Animal Behavior.

Rinn, J. L. and Chang, H. Y. (2012) Genome Regulation by Long Noncoding RNAs., *Annual Review of Biochemistry.*, 81(1), p.: 145–166.

Roberts, T. C., Coenen-Stass, A. M. L. and Wood, M. J. A. (2014) Assessment of RT-qPCR Normalization Strategies for Accurate Quantification of Extracellular microRNAs in Murine Serum., *PLoS ONE*. Edited by P. Mukhopadhyay. Public Library of Science, 9(2), p.: e89237.

Roche (2009) LightCycler[®] Real-Time PCR Systems Application Manual. Available at: http://plantbio.okstate.edu/images/pdfs/Roche_RT-PCR_Manual.pdf (Accessed: 8 June 2018).

Roche (2017) *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit*.

Ronckers, C. M., Land, C. E., Miller, J. S., Stovall, M., Lonstein, J. E. and Doody, M. M. (2010) Cancer mortality among women frequently exposed to radiographic examinations for spinal disorders., *Radiation research.*, 174(1), p.: 83–90.

De Ronde, M. W. J., Ruijter, J. M., Lanfear, D., Bayes-Genis, A., Kok, M. G. M., Creemers, E. E., Pinto, Y. M. and Pinto-Sietsma, S. J. (2017) Practical data handling pipeline improves performance of qPCR-based circulating miRNA measurements., *RNA*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 23(5), p.: 811–821.

Roughley, P. J., Lamplugh, L., Lee, E. R., Matsumoto, K. and Yamaguchi, Y. (2011) The role of hyaluronan produced by Has2 gene expression in development of the spine., *Spine.*, 36(14), p.: E914-20.

Saidak, Z., LeHenaff, C., Azzi, S., Marty, C., Da Nascimento, S., Sonnet, P. and Marie, P. J. (2015) Wnt/ β -catenin signaling mediates osteoblast differentiation triggered by peptide-induced $\alpha 5\beta 1$ integrin priming in mesenchymal skeletal cells., *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 290(11), p.: 6903–6912.

Sánchez-De-La-Torre, M., Khalyfa, A., Sánchez-De-La-Torre, A., Martínez-Alonso, M., Martínez-García, M. Á., Barceló, A., Lloberes, P., Campos-Rodríguez, F., Capote, F., Díaz-De-Atauri, M. J., *et al.* (2015) Precision Medicine in Patients With Resistant Hypertension and Obstructive Sleep Apnea Blood Pressure Response to Continuous Positive Airway Pressure Treatment., *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier USA, 66(9), p.: 1023–1032.

Sayed, D. and Abdellatif, M. (2011) Micrnas in development and disease., *Physiological Reviews*. *Physiol Rev*, 91(3), p.: 827–887.

Schmittgen, T. D., Jiang, J., Liu, Q. and Yang, L. (2004) A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors., *Nucleic acids research*. *Nucleic Acids Res*, 32(4).

Schwarzenbach, H., Machado, A., Silva, D., Calin, G. and Pantel, K. (2015) Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification., *Clinical Chemistry.*, 61(11), p.: 1–10.

Seco-Cervera, M., González-Rodríguez, D., Ibáñez-Cabellos, J. S., Peiró-Chova, L., Pallardó, F. V and García-Giménez, J. L. (2018) Small RNA-seq analysis of circulating miRNAs to identify phenotypic variability in Friedreich's ataxia patients., *Scientific Data*. Nature Publishing Group, 5, p.: 180021.

- Seibel, M. J., Robins, S. P. and Bilezikian, J. P. (2006) *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism: Principles and Clinical Applications*. Second.
- Selzam, S., Ritchie, S. J., Pingault, J. B., Reynolds, C. A., O'Reilly, P. F. and Plomin, R. (2019) Comparing Within- and Between-Family Polygenic Score Prediction., *American Journal of Human Genetics*. Cell Press, 105(2), p.: 351–363.
- Shah, J. S., Soon, P. S. and Marsh, D. J. (2016) Comparison of Methodologies to Detect Low Levels of Hemolysis in Serum for Accurate Assessment of Serum microRNAs., *PloS one*. Public Library of Science, 11(4), p.: e0153200.
- Sharma, S., Londono, D., Eckalbar, W. L., Gao, X., Zhang, D., Mauldin, K., Kou, I., Takahashi, A., Matsumoto, M., Kamiya, N., *et al.* (2015) A PAX1 enhancer locus is associated with susceptibility to idiopathic scoliosis in females., *Nature communications*., 6, p.: 6452.
- Shi, B., Xu, Liang, Mao, S., Xu, Leilei, Liu, Z., Sun, X., Zhu, Z. and Qiu, Y. (2018) Abnormal PITX1 gene methylation in adolescent idiopathic scoliosis: A pilot study., *BMC Musculoskeletal Disorders*. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 19(1), p.: 1–6.
- Shi, B., Mao, S., Xu, L., Li, Y., Sun, X., Liu, Z., Zhu, Z. and Qiu, Y. (2019) Quantitation Analysis of PCDH10 Methylation In Adolescent Idiopathic Scoliosis Using Pyrosequencing Study., *SPINE*., p.: 1.
- Shi, R. and Chiang, V. L. (2005) Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR., *BioTechniques*. Eaton Publishing Company, 39(4), p.: 519–524.
- Shiotsu, H., Okada, K., Shibuta, T., Kobayashi, Y., Shirahama, S., Kuroki, C., Ueda, S., Ohkuma, M., Ikeda, K., Ando, Y., *et al.* (2018) The Influence of Pre-analytical Factors on the Analysis of Circulating MicroRNA., *MicroRNA*. Bentham Science Publishers Ltd., 7(3), p.: 195–203.
- Shrivastava, A. and Gupta, V. (2011) Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods., *Chronicles of Young Scientists*., 2(1), p.: 21.
- Siegel, R., Naishadham, D. and Jemal, A. (2013) *Cancer statistics, 2013*., CA: a cancer journal for clinicians. *CA Cancer J Clin*, 63(1), p.: 11–30.
- Sigma-Aldrich (2008) *qPCR technical guide*.
- Sigma-Aldrich (no date) <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/technical-article/genomics/pcr/assay-optimization-and-validation>.
- Simony, A, Hansen, E. J., Christensen, S. B., Carreon, L. Y. and Andersen, M. O. (2016) Incidence of cancer in adolescent idiopathic scoliosis patients treated 25 years previously., *Eur Spine J*., 25(10), p.: 3366–3370.
- Simony, Ane, Hansen, E. J., Christensen, S. B., Carreon, L. Y. and Andersen, M. O. (2016) Incidence of cancer in adolescent idiopathic scoliosis patients treated 25 years previously., *European Spine Journal*., 25(10), p.: 3366–3370.
- Sivakamasundari, V., Kraus, P., Sun, W., Hu, X., Lim, S. L., Prabhakar, S. and Lufkin, T. (2017) A developmental transcriptomic analysis of Pax1 & Pax9 in embryonic intervertebral disc development., *Biology Open*. Company of Biologists Ltd, 6(2), p.: 187–199.
- Skogland, L. B. and Miller, J. A. A. (1980) Growth related hormones in idiopathic scoliosis: An endocrine basis for accelerated growth., *Acta Orthopaedica*. Informa Healthcare, 51(1–6), p.: 779–789.
- Smith, M. (2021) Validating Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Assays., *Encyclopedia*

of Virology. Elsevier, p.: 35.

Stokes, O. M. and Luk, K. D. K. (2013) The current status of bracing for patients with adolescent idiopathic scoliosis., *The Bone & Joint Journal*, 95-B(10), p.: 1308–1316.

Sugatani, T. and Hruska, K. A. (2007) MicroRNA-223 is a key factor in osteoclast differentiation., *J Cell Biochem*, 101(4), p.: 996–999.

Sun, Z. J., Jia, H. M., Qiu, G. X., Zhou, C., Guo, S., Zhang, J. G., Shen, J. X., Zhao, Y. and Zou, Z. M. (2016) Identification of candidate diagnostic biomarkers for adolescent idiopathic scoliosis using UPLC/QTOF-MS analysis: a first report of lipid metabolism profiles., *Sci Rep*, 6(1), p.: 22274.

Sunderland, N., Skroblin, P., Barwari, T., Huntley, R. P., Lu, R., Joshi, A., Lovering, R. C. and Mayr, M. (2017) MicroRNA Biomarkers and Platelet Reactivity: The Clot Thickens., *Circulation Research*. Lippincott Williams and Wilkins, p.: 418–435.

Szabo, G. and Bala, S. (2013) MicroRNAs in liver disease., *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group, p.: 542–552.

Tabas, J. A., Zasloff, M., Wasmuth, J. J., Emanuel, B. S., Altherr, M. R., McPherson, J. D., Wozney, J. M. and Kaplan, F. S. (1991) Bone morphogenetic protein: chromosomal localization of human genes for BMP1, BMP2A, and BMP3., *Genomics*, 9(2), p.: 283–289. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2004778>.

Takahashi, Y., Kou, I., Takahashi, A., Johnson, T. A., Kono, K., Kawakami, N., Uno, K., Ito, M., Minami, S., Yanagida, H., *et al.* (2011) A genome-wide association study identifies common variants near *LBX1* associated with adolescent idiopathic scoliosis., *Nature genetics*, 43(12), p.: 1237–40.

Takeda, K., Kou, I., Otomo, N., Grauers, A., Fan, Y. H., Ogura, Y., Takahashi, Y., Momozawa, Y., Einarsdottir, E., Kere, J., *et al.* (2019) A multiethnic meta-analysis defined the association of rs12946942 with severe adolescent idiopathic scoliosis., *Journal of Human Genetics*. Nature Publishing Group, 64(5), p.: 493–498.

TAMiRNA (2016) *TechNote TN-01 : The impact of sample type (serum and EDTA-plasma) and platelet contamination on osteomiR detection.*

Tan, G. W., Khoo, A. S. B. and Tan, L. P. (2015) Evaluation of extraction kits and RT-qPCR systems adapted to high-throughput platform for circulating miRNAs., *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 5(1), p.: 1–8.

Tang, F., Hajkova, P., Barton, S. C., Lao, K. and Surani, M. A. (2006) MicroRNA expression profiling of single whole embryonic stem cells., *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 34(2), p.: e9.

Tang, N. L. S., Yeung, H.-Y., Hung, V. W. Y., Di Liao, C., Lam, T.-P., Yeung, H.-M., Lee, K.-M., Ng, B. K.-W. and Cheng, J. C.-Y. (2012) Genetic epidemiology and heritability of AIS: A study of 415 Chinese female patients., *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 30(9), p.: 1464–9.

Tang, Q. L., Julien, C., Eveleigh, R., Bourque, G., Franco, A., Labelle, H., Grimard, G., Parent, S., Ouellet, J., Mac-Thiong, J.-M. M., *et al.* (2015) A Replication Study for Association of 53 Single Nucleotide Polymorphisms in ScolioScore Test with Adolescent Idiopathic Scoliosis in French-Canadian Population., *Spine*. Lippincott Williams and Wilkins, 40(8), p.: 537–543.

TaqMan® Gene Expression Assays Protocol For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures (2010).

- Taryma-Leśniak, O., Sokolowska, K. E. and Wojdacz, T. K. (2020) Current status of development of methylation biomarkers for in vitro diagnostic IVD applications., *Clinical Epigenetics*. BioMed Central, p.: 1–16.
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M. and Nguyen, M. (2010) A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines., *Methods*. Academic Press Inc., p.: S1.
- ThermoFisher Scientific (2015) *QuantStudio Design and Analysis desktop software User Guide*.
- ThermoFisher Scientific (no date) *Cuantificación relativa o absoluta para qPCR*.
- thrombomiR TM kit Wet Lab Instruction Manual v3.0 microRNA Biomarkers of Platelet Function stability for life* (2020). Available at: www.tamirna.com/ (Accessed: 29 June 2021).
- Tong, L., Xue, H., Xiong, L., Xiao, J. and Zhou, Y. (2015) Improved RT-PCR Assay to Quantitate the Pri-, Pre-, and Mature microRNAs with Higher Efficiency and Accuracy., *Molecular Biotechnology*. Humana Press Inc., 57(10), p.: 939–946.
- Trebicka, J., Anadol, E., Elfimova, N., Strack, I., Roggendorf, M., Viazov, S., Wedemeyer, I., Drebber, U., Rockstroh, J., Sauerbruch, T., *et al.* (2013) Hepatic and serum levels of miR-122 after chronic HCV-induced fibrosis., *Journal of Hepatology*. Elsevier, 58(2), p.: 234–239.
- Tuck, M. K., Chan, D. W., Chia, D., Godwin, A. K., Grizzle, W. E., Krueger, K. E., Rom, W., Sanda, M., Sorbara, L., Stass, S., *et al.* (2009) Standard operating procedures for serum and plasma collection: Early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group., *Journal of Proteome Research*. J Proteome Res, 8(1), p.: 113–117.
- Ueno, T. and Funatsu, T. (2014) Label-free quantification of microRNAs using ligase-assisted sandwich hybridization on a DNA microarray., *PLoS ONE*. Public Library of Science, 9(3).
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes., *Genome biology*., 3(7), p.: RESEARCH0034. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184808> (Accessed: 2 August 2017).
- Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F. and Hellens, R. P. (2007) Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs., *Plant methods*. BioMed Central, 3, p.: 12.
- Varkonyi-Gasic, E. and Hellens, R. P. (2011) Quantitative stem-loop RT-PCR for detection of microRNAs., *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). Humana Press, 744, p.: 145–157.
- Villa, M. (2015) Genes Associated with Adolescent Idiopathic Scoliosis: A Review., *Hereditary Genetics*. OMICS International, 04(02), p.: 1–4.
- Vonhögen, I. G. C., Mohseni, Z., Winkens, B., Xiao, K., Thum, T., Calore, M., da Costa Martins, P. A., de Windt, L. J., Spaanderman, M. E. A. and Ghossein-Doha, C. (2020) Circulating miR-216a as a biomarker of metabolic alterations and obesity in women., *Non-coding RNA Research*. KeAi Communications Co., 5(3), p.: 144–152.
- Wakabayashi, I., Sotoda, Y. and Eguchi, R. (2020) Contribution of platelet-derived microRNAs to serum microRNAs in healthy men., *Platelets*. Taylor and Francis Ltd, p.: 1–4.
- Wang, B. and 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*. J Cancer Res Clin Oncol, 138(10), p.: 1659–1666.

- Wang, F., Zhou, X.-Y. Y., Xu, X.-M. M., Lu, Y.-H. H., Zhu, X.-D. D., Bai, Y.-S. S., Wei, X.-Z. Z. and Li, M. (2016) Assessment of varied long noncoding RNA and messenger RNA expression levels in adolescent idiopathic scoliosis., *International Journal of Clinical and Experimental Medicine.*, 9(5), p.: 8031–8038. Available at: www.ijcem.com/ (Accessed: 22 January 2020).
- Wang, K., Long, B., Liu, F., Wang, J. X., Liu, C. Y., Zhao, B., Zhou, L. Y., Sun, T., Wang, M., Yu, T., *et al.* (2016) A circular RNA protects the heart from pathological hypertrophy and heart failure by targeting miR-223., *European Heart Journal.*, 37(33), p.: 2602a-2611a.
- Wang, S. T., Liu, J. J., Wang, C. Z., Lin, B., Hao, Y. Y., Wang, Y. F., Gao, S., Qi, Y., Zhang, S. L. and Iwamori, M. (2012) Expression and correlation of Lewis y antigen and TGF-beta1 in ovarian epithelial carcinoma., *Oncol Rep.*, 27(4), p.: 1065–1071.
- Wang, T. and Xu, Z. (2010) miR-27 promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling., *Biochem Biophys Res Commun.*, 402(2), p.: 186–189.
- Wang, W., Ma, J., Li, S. yuan, Wu, X., Hu, B., Wang, X. feng and Zhou, X. hui (2015) Advance on genetic mechanism of adolescent idiopathic scoliosis and genetic relationship map., *Zhongguo gu shang = China journal of orthopaedics and traumatology.*, 28(9), p.: 854–860.
- Wang, W. J., Yeung, H. Y., Chu, W. C.-W., Tang, N. L.-S., Lee, K. M., Qiu, Y., Burwell, R. G. and Cheng, J. C. Y. (2011) Top theories for the etiopathogenesis of adoles cent idiopathic scoliosis., *Journal of pediatric orthopedics.*, 31(1 Suppl), p.: S14-27.
- Wapinski, O. and Chang, H. Y. (2011) Long noncoding RNAs and human disease., *Trends in Cell Biology.* Elsevier Ltd, 21(6), p.: 354–361.
- Ward, K., Ogilvie, J., Argyle, V., Nelson, L., Meade, M., Braun, J. and Chettier, R. (2010) Polygenic inheritance of adolescent idiopathic scoliosis: A study of extended families in Utah., *American Journal of Medical Genetics, Part A.*, 152(5), p.: 1178–1188.
- Watanabe, K., Michikawa, T., Yonezawa, I., Takaso, M., Minami, S., Soshi, S., Tsuji, T., Okada, E., Abe, K., Takahashi, M., *et al.* (2017) Physical Activities and Lifestyle Factors Related to Adolescent Idiopathic Scoliosis., *The Journal of bone and joint surgery. American volume.*, 99(4), p.: 284–294.
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., How Huang, K., Jen Lee, M., Galas, D. J. and Wang, K. (2010) The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids., *Clinical Chemistry.*, 56(11), p.: 1733–1741.
- Weilner, S., Skalicky, S., Salzer, B., Keider, V., Wagner, M., Hildner, F., Gabriel, C., Dovjak, P., Pietschmann, P., Grillari-Voglauer, R., *et al.* (2015) Differentially circulating miRNAs after recent osteoporotic fractures can influence osteogenic differentiation., *Bone.* Elsevier Inc., 79, p.: 43–51.
- Weilner, S., Schraml, E., Wieser, M., Messner, P., Schneider, K., Wassermann, K., Micutkova, L., Fortschegger, K., Maier, A. B., Westendorp, R., *et al.* (2016) Secreted microvesicular miR-31 inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells., *Aging cell.*, 15(4), p.: 744–54.
- Weinstein, S. L. (1999) Natural history., *Spine.*, p.: 2592–2600.
- Weinstein, S. L., Dolan, L. A., Cheng, J. C., Danielsson, A. and Morcuende, J. A. (2008) Adolescent idiopathic scoliosis., *The Lancet.* Elsevier, 371(9623), p.: 1527–1537.
- Weinstein, S. L. (2019) The Natural History of Adolescent Idiopathic Scoliosis., *Journal of Pediatric Orthopaedics.* Lippincott Williams and Wilkins, 39(6), p.: S44–S46.
- Weiss, H. R. and Goodall, D. (2008) Rate of complications in scoliosis surgery - A systematic

review of the Pub Med literature., Scoliosis.

Willeit, P., Zampetaki, A., Dudek, K., Kaudewitz, D., King, A., Kirkby, N. S., Crosby-Nwaobi, R., Prokopi, M., Drozdov, I., Langley, S. R., *et al.* (2013) Circulating MicroRNAs as novel biomarkers for platelet activation., *Circulation Research. Circ Res*, 112(4), p.: 595–600.

Willeit, P., Skroblin, P., Moschen, A. R., Yin, X., Kaudewitz, D., Zampetaki, A., Barwari, T., Whitehead, M., Ramírez, C. M., Goedeke, L., *et al.* (2017) Circulating MicroRNA-122 is associated with the risk of new-onset metabolic syndrome and type 2 diabetes., *Diabetes. American Diabetes Association Inc.*, 66(2), p.: 347–357.

Wise, C. A. and Ikegawa, S. (2018) Current understanding of genetic factors in idiopathic scoliosis., in *The Genetics and Development of Scoliosis: Second Edition*. Springer International Publishing, p.: 139–157.

Wolfinger, R. D., Beedanagari, S., Boitier, E., Chen, T., Couttet, P., Ellinger-Ziegelbauer, H., Guillemain, G., Mariet, C., Mouritzen, P., O’Lone, R., *et al.* (2018) Two approaches for estimating the lower limit of quantitation (LLOQ) of microRNA levels assayed as exploratory biomarkers by RT-qPCR., *BMC Biotechnology. BioMed Central Ltd.*, 18(1).

Wu, C.-S., Lin, F.-C., Chen, S.-J., Chen, Y.-L., Chung, W.-J. and Cheng, C.-I. (2016) Optimized Collection Protocol for Plasma MicroRNA Measurement in Patients with Cardiovascular Disease., *BioMed Research International. Hindawi*, 2016, p.: 1–12.

Wu, Z., Wang, Y., Dai, Z., Qiu, Y., Xu, L. and Zhu, Z. (2019) Genetic Variants of ABO and SOX6 are Associated with Adolescent Idiopathic Scoliosis in Chinese Han Population., *Spine. Lippincott Williams and Wilkins*, 44(18), p.: E1063–E1067.

Wybier, M. and Bossard, P. (2013) Musculoskeletal imaging in progress: The EOS imaging system., *Joint Bone Spine.*, 80, p.: 238–243.

Xiong, B., Cheng, Y., Ma, L. and Zhang, C. (2013) MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3 K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells., *International journal of oncology.*, 42(1), p.: 219–28.

Xu, E., Shao, W., Jiang, H., Lin, T., Gao, R. and Zhou, X. (2019) A Genetic Variant in GPR126 Causing a Decreased Inclusion of Exon 6 Is Associated with Cartilage Development in Adolescent Idiopathic Scoliosis Population., *BioMed Research International. Hindawi Limited*, 2019.

Xu, J. F., Yang, G. hai, Pan, X. H., Zhang, S. J., Zhao, C., Qiu, B. S., Gu, H. F., Hong, J. F., Cao, L., Chen, Y., *et al.* (2015) Association of GPR126 gene polymorphism with adolescent idiopathic scoliosis in Chinese populations., *Genomics. Academic Press Inc.*, 105(2), p.: 101–107.

Xu, L., Qiu, X., Sun, X., Mao, S., Liu, Z., Qiao, J. and Qiu, Y. (2011) Potential genetic markers predicting the outcome of brace treatment in patients with adolescent idiopathic scoliosis., *European Spine Journal.*, 20(10), p.: 1757–1764.

Xu, L., Huang, S., Qin, X., Mao, S., Qiao, J., Qian, B.-P. P., Qiu, Y. and Zhu, Z. (2015) Investigation of the 53 Markers in a DNA-Based Prognostic Test Revealing New Predisposition Genes for Adolescent Idiopathic Scoliosis., *Spine. Lippincott Williams and Wilkins*, 40(14), p.: 1086–1091.

Xu, L., Sheng, F., Xia, C., Qin, X., Tang, N. L.-S., Qiu, Y., Cheng, J. C.-Y. and Zhu, Z. (2018) Genetic Variant of PAX1 Gene Is Functionally Associated With Adolescent Idiopathic Scoliosis in the Chinese Population., *Spine.*, 43(7), p.: 492–496.

Xu, L., Wu, Z., Xia, C., Tang, N., Cheng, J. C. Y., Qiu, Y. and Zhu, Z. (2019) A Genetic Predictive Model Estimating the Risk of Developing Adolescent Idiopathic Scoliosis., *Current Genomics*.

Bentham Science Publishers Ltd., 20(4), p.: 246–251.

Xu, T., Liao, Z., O'Reilly, M. S., Levy, L. B., Welsh, J. W., Wang, L. E., Lin, S. H., Komaki, R., Liu, Z., Wei, Q., *et al.* (2014) Serum inflammatory miRNAs predict radiation esophagitis in patients receiving definitive radiochemotherapy for non-small cell lung cancer., *Radiotherapy and Oncology*. Elsevier Ireland Ltd, 113(3), p.: 379–384.

Ye, J., Xu, M., Tian, X., Cai, S. and Zeng, S. (2019) Research advances in the detection of miRNA., *Journal of Pharmaceutical Analysis*. Xi'an Jiaotong University, p.: 217–226.

Yeh, C.-H., Jin, L., Shen, F., Balian, G. and Li, X. J. (2016) miR-221 attenuates the osteogenic differentiation of human annulus fibrosus cells., *The spine journal : official journal of the North American Spine Society.*, 16(7), p.: 896–904.

Yi, R., Zhu, Z., Hu, J., Qian, Q., Dai, J. and Ding, Y. (2013) Identification and Expression Analysis of microRNAs at the Grain Filling Stage in Rice(*Oryza sativa* L.)via Deep Sequencing., *PLoS ONE*. Public Library of Science, 8(3).

Yong, S. L. and Dutta, A. (2009) MicroRNAs in cancer., *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. Annu Rev Pathol, p.: 199–227.

Your reverse transcription may not be optimal | Thermo Fisher Scientific - ES (no date). Available at: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-troubleshooting-tool/gene-expression-quantitation-troubleshooting/abnormal-amplification-curves/amplification-occurs-later/your-reverse-transcription-may-not-be-optimal.html> (Accessed: 29 July 2020).

Zampetaki, A., Kiechl, S., Drozdov, I., Willeit, P., Mayr, U., Prokopi, M., Mayr, A., Weger, S., Oberhollenzer, F., Bonora, E., *et al.* (2010) Plasma MicroRNA profiling reveals loss of endothelial MiR-126 and other MicroRNAs in type 2 diabetes., *Circulation Research*. Circ Res, 107(6), p.: 810–817.

Zampetaki, A., Willeit, P., Tilling, L., Drozdov, I., Prokopi, M., Renard, J. M., Mayr, A., Weger, S., Schett, G., Shah, A., *et al.* (2012) Prospective study on circulating microRNAs and risk of myocardial infarction., *Journal of the American College of Cardiology*. J Am Coll Cardiol, 60(4), p.: 290–299.

Zaydman, A. M., Strokova, E. L., Stepanova, A. O., Laktionov, P. P., Shevchenko, A. I. and Subbotin, V. M. (2019) A new look at causal factors of idiopathic scoliosis: Altered expression of genes controlling chondroitin sulfate sulfation and corresponding changes in protein synthesis in vertebral body growth plates., *International Journal of Medical Sciences*. Ivyspring International Publisher, 16(2), p.: 221–230.

Zhang, H. Q., Wang, L. J., Liu, S. H., Li, J., Xiao, L. G. and Yang, G. T. (2019) Adiponectin regulates bone mass in AIS osteopenia via RANKL/OPG and IL6 pathway., *Journal of Translational Medicine*. BioMed Central Ltd., 17(1).

Zhang, H. W., Ding, J., Jin, J. L., Guo, J., Liu, J. N., Karaplis, A., Goltzman, D. and Miao, D. (2010) Defects in mesenchymal stem cell self-renewal and cell fate determination lead to an osteopenic phenotype in Bmi-1 null mice., *J Bone Miner Res*. 2009/08/06, 25(3), p.: 640–652.

Zhang, J., Chen, H., Leung, R. K. K., Choy, K. W., Lam, T.-P., Ng, B. K. W., Qiu, Y., Feng, J. Q., Cheng, J. C. Y. and Lee, W. Y. W. (2018) Aberrant miR-145-5p/ β -catenin signal impairs osteocyte function in adolescent idiopathic scoliosis., *The FASEB Journal.*, 32(11), p.: fj.201800281.

Zhang, J., Cheuk, K. yee, Xu, L., Wang, Y., Feng, Z., Sit, T., Cheng, K. lo, Nepotchatykh, E., Lam, T. ping, Liu, Z., *et al.* (2020a) A validated composite model to predict risk of curve progression in

adolescent idiopathic scoliosis., *EClinicalMedicine*. Lancet Publishing Group, 18.

Zhang, J., Cheuk, K. yee, Xu, L., Wang, Y., Feng, Z., Sit, T., Cheng, K. lo, Nepotchatykh, E., Lam, T. ping, Liu, Z., *et al.* (2020b) A validated composite model to predict risk of curve progression in adolescent idiopathic scoliosis., *EClinicalMedicine*. Elsevier, 18, p.: 100236.

Zhang, K., Kang, D. K., Ali, M. M., Liu, L., Labanieh, L., Lu, M., Riazifar, H., Nguyen, T. N., Zell, J. A., Digman, M. A., *et al.* (2015) Digital quantification of miRNA directly in plasma using integrated comprehensive droplet digital detection., *Lab on a Chip*. Royal Society of Chemistry, 15(21), p.: 4217–4226.

Zhang, X., Schwarz, E. M., Young, D. A., Puzas, J. E., Rosier, R. N. and O’Keefe, R. J. (2002) Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair., *Journal of Clinical Investigation*., 109(11), p.: 1405–1415.

Zhang, Y., Gu, Z. and Qiu, G. (2014) The association study of calmodulin 1 gene polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis., *BioMed Research International*., 2014.

Zhelankin, A. V., Vasiliev, S. V., Stonogina, D. A., Babalyan, K. A., Sharova, E. I., Doludin, Y. V., Shchekochikhin, D. Y., Generozov, E. V. and Akselrod, A. S. (2020) Elevated plasma levels of circulating extracellular miR-320a-3p in patients with paroxysmal atrial fibrillation., *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, 21(10).

Zhu, Z., Tang, N., Xu, L., Qin, X., Mao, S., Song, Y., Liu, L., Li, F., Liu, P., Yi, L., *et al.* (2015) Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for adolescent idiopathic scoliosis in Chinese girls., *Nature communications*., 6, p.: 8355.

Zhu, Z., Xu, L., Leung-Sang Tang, N., Qin, X., Feng, Z., Sun, W., Zhu, W., Shi, B., Liu, P., Mao, S., *et al.* (2017) Genome-wide association study identifies novel susceptible loci and highlights Wnt/beta-catenin pathway in the development of adolescent idiopathic scoliosis., *Human molecular genetics*., 26(8), p.: 1577–1583.

Zhuang, Q., Mao, W., Xu, P., Li, H., Sun, Z., Li, S., Qiu, G., Li, J. and Zhang, J. (2016) Identification of Differential Genes Expression Profiles and Pathways of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells of Adolescent Idiopathic Scoliosis Patients by Microarray and Integrated Gene Network Analysis., *SPINE*., 41(10), p.: 840–855.

Zhuang, Q., Ye, B., Hui, S., Du, Y., Zhao, R. C., Li, J., Wu, Z., Li, N., Zhang, Y., Li, H., *et al.* (2019) Long noncoding RNA IncAIS downregulation in mesenchymal stem cells is implicated in the pathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis., *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group, 26(9), p.: 1700–1715.

Zou, W., Izawa, T., Zhu, T., Chappel, J., Otero, K., Monkley, S. J., Critchley, D. R., Petrich, B. G., Morozov, A., Ginsberg, M. H., *et al.* (2013) Talin1 and Rap1 Are Critical for Osteoclast Function., *Molecular and Cellular Biology*., 33(4), p.: 830–844.

ANEXOS

“ESTUDIO OBSERVACIONAL AMBISPECTIVO PARA LA VALIDACIÓN CLÍNICA A PEQUEÑA ESCALA DE LA FUNCIÓN PRONÓSTICO DEL TEST ScolioPro® A PARTIR DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE ESCOLIOSIS IDIOPÁTICA ADOLESCENTE (EIA), CON RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS DESDE EL MOMENTO DE DIAGNÓSTICO”

Promotor:	EpiDisease S. L.
Tipo de Documento:	Protocolo de un Proyecto de Investigación
Versión:	2.0
Fecha Versión:	30/07/2018

Aviso: Parte o toda la información presentada en este documento puede ser material no publicado y debe ser tratado como **confidencial y propiedad del promotor**, de ninguna manera será divulgado a persona no autorizada, incluyendo publicaciones y presentaciones, sin una autorización por escrito del Promotor.

1. Resumen

Promotor del Estudio	EpiDisease S. L. C/ Catedrático Agustín Escardino nº 9, 46980 Paterna (València) Tel.: 960 42 01 57
Título del Estudio	“Estudio observacional ambispectivo para la validación clínica a pequeña escala de la función pronóstico del test Scolipro® a partir de pacientes diagnosticados de Escoliosis Idiopática Adolescente (EIA), con recogida de datos clínicos desde el momento del diagnóstico”
Código del Estudio	E.01
Tipo de Centros Donde se Prevé Realizar el Estudio	Dos hospitales públicos de València: Hospital Universitari i Politècnic La Fe y Hospital Universitario Doctor Peset.
Comité Ético que Evalúa el Estudio	Comité Ético de Investigación con medicamentos del Hospital Universitario y Politécnico de La Fe (CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe) y Comité Ético de Investigación con Medicamentos (CEIm) del Hospital Universitario Doctor Peset. Comité Ético de Investigación Clínica del Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP) (Cesión de Muestras)
Objetivos	<u>Objetivo principal</u> Evaluar, en ensayo a pequeña escala, el valor pronóstico del test Scolipro® en pacientes con EIA, analizando una firma de miARNs circulantes como biomarcadores. <u>Objetivos secundarios</u> - Evaluar la validez del test (sensibilidad y especificidad) y seguridad (valores predictivos). - Identificar las potenciales asociaciones entre las variables clínicas de los pacientes y los niveles de expresión de los miARNs seleccionados. - Desarrollar un algoritmo de predicción para EIA.
Diseño	Se trata de un estudio ambispectivo, ya que junto con el seguimiento prospectivo se realizará la recogida de datos

	clínicos de forma retrospectiva desde el momento de diagnóstico.
Enfermedad o Trastorno en Estudio	Escoliosis Idiopática Adolescente (EIA)
Datos del Producto Sanitario Objeto de Estudio	Kit Scolipro®
Población en Estudio y Número Total de Sujetos	<p>Pacientes diagnosticados de escoliosis idiopática adolescente (ángulo de Cobb > 15°), con edades entre los 10 y menores de 18 años de edad.</p> <p>En el estudio se incluirán 50 individuos de los centros ubicados en València, Hospital Universitari i Politècnic La Fe y Hospital Universitario Doctor Peset.</p>
Calendario	<p>El estudio tendrá una duración de 18 meses, con tres puntos de seguimiento o control del paciente:</p> <p>t₀: toma de la primera muestra.</p> <p>t_i: monitorización intermedia (en los meses 6 al 9 después de la toma de la primera muestra)</p> <p>t_f: monitorización final (en los meses 12 al 15 después de la toma de la primera muestra)</p>
Fuente de Financiación	Proyecto Neotec de CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial)

2. Índice

1. Resumen.....	2
2. Índice	4
Abreviaturas.....	7
3. Información general	9
3.1 Identificación del estudio.....	9
3.2 Datos del promotor	9
3.3 Identificación del monitor	9
3.4 Duración prevista	9
4. Justificación del estudio.....	9
4.1 Antecedentes.....	9
4.2 Justificación del estudio.....	11
5. Objetivos del estudio	12
5.1 Objetivo principal	12
5.2 Objetivo secundario	13
6. Criterios de valoración	13
6.1 Criterios de valoración principal	13
6.2 Criterios de valoración secundarios	13
7. Fuente de información y ámbito.....	13
8. Diseño del estudio	13
8.1 Población de estudio.....	13
8.1.1 Criterios de inclusión	14
8.1.2 Criterios de exclusión	14
8.2 Criterios de retirada.....	14
8.3 Periodo de observación	14
8.4 Descripción del procedimiento.....	15
8.5 Determinación del tamaño de la muestra	15
9. Variables e instrumentos de medida	15
9.1 Variables demográficas	15
9.2 Variables clínicas	16
9.3 Variables relativas al test ScolioPro®.....	17
9.4 Otras variables.....	18
9.5 Recogida de datos.....	18
9.5.1 Recogida de datos clínicos.....	18
9.5.2 Recogida de datos de los análisis de las muestras.	19
10. Análisis estadístico	19
10.1 Aspectos generales del análisis estadístico	19
10.2 Aspectos específicos del análisis estadístico.....	20
11. Aspectos éticos.....	20

11.1	Evaluación beneficio-riesgo	21
11.2	Hoja de información y consentimiento informado	22
11.3	Confidencialidad de los datos	23
11.4	Interferencia con los hábitos de prescripción del médico	23
12.	Consideraciones prácticas	23
12.1	Plan de trabajo	23
12.1.1	Muestras biológicas	24
12.2	Procedimiento de comunicación de reacciones adversas	25
12.3	Uso de medios electrónicos	25
12.4	Informe final de resultados	26
12.5	Difusión de los resultados	26
13.	Responsabilidades del estudio	26
13.1	Responsabilidades del promotor	26
13.2	Responsabilidades de los investigadores	27
14.	Bibliografía	28
Anexo I: PNT de EpiDisease ID.G.001 OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUINEAS PARA EXTRACCIÓN DE miARNs		29
Anexo II: de EpiDisease D.002. METODOLOGÍA PARA LA CODIFICACIÓN DE DOCUMENTOS Y MUESTRAS		31
.....		31
Anexo III: PNT de EpiDisease ID.G.002 OBTENCIÓN Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE PLASMA PARA ANÁLISIS DE miARNs		32
Anexo IV: PNT de EpiDisease ID.T.001 EXTRACCIÓN DE miARNs DE MUESTRAS DE PLASMA/SUERO CON EL KIT miRNeasy SERUM/PLASMA KIT (QIAGEN)		33
Anexo V: PNT de EpiDisease ID.PE.001. CUANTIFICACIÓN DE RNA MEDIANTE NANODROP™ 2000 SPECTROPHOTOMETER (THERMO SCIENTIFIC)		36
Anexo VI: PNT de EpiDisease PNT: ID.T.002 CUANTIFICACIÓN miARNs POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON RETROTRANSCRIPCIÓN		37
Índice figuras		
Figura 1. Esquema del estudio		25

Abreviaturas

ARN:	Ácido Ribonucleico
AEMPS:	Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios
CE:	Comité Ético
CEI:	Comité Ético de Investigación
CEIC:	Comité Ético de Investigación Clínica
CEIm:	Comité Ético de Investigación con Medicamentos
CEO:	Chief Executive Officer (Director Ejecutivo)
CI:	Consentimiento informado
CIBERER:	Centro de Investigación Biomédica en Red- Enfermedades Raras
CSISP:	Centro Superior de Investigación en Salud Pública
CDTI:	Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial
CFR:	Code of Federal Regulations (Código de Regulaciones Federales)
CRO:	Contract Research Organization (empresa de investigación por contrato)
DG:	Dirección General
e- CRD:	Cuaderno de recogida de datos electrónico
EI:	Escoliosis idiopática
EIA:	Escoliosis Idiopática Adolescente
GMP:	Good Manufacturing Practice (Buenas Prácticas de Fabricación)
IVD:	Diagnóstico in vitro
LOPD:	Ley Orgánica de protección de datos
miARN:	microARN
PNT:	Procedimiento normalizado de trabajo.
RD:	Real Decreto
RGPD:	Reglamento General de Protección de Datos

ROC: Receiver Operating Characteristic (Característica Operativa del Receptor)

SP: Salud Pública

3. Información general

3.1 *Identificación del estudio*

1. **Código de protocolo:** E.01.
2. **Título:** “Estudio observacional ambispectivo para la validación clínica a pequeña escala de la función pronóstico del test ScolioPro® a partir de pacientes diagnosticados de Escoliosis Idiopática Adolescente (EIA), con recogida de datos clínicos desde el momento del diagnóstico”

3.2 *Datos del promotor*

EpiDisease S. L.
Catedrático Agustín Escardino nº 9, 46980 Paterna (València)
Contacto: José Luis García Giménez, PhD.
CEO EpiDisease S.L.
Tlf: +34 960 420 157
www.epidisease.com

3.3 *Identificación del monitor*

Experior, S.L.
C/ Vicente Galmés, 1A; 46139 La Pobla de Farnals (València)
Tel.: 902 105 255; Fax: 961 452 191

3.4 *Duración prevista*

- Presentación del estudio al Comité Ético: Junio de 2018
- Activación de centros: Julio de 2018
- Inclusión de datos: Julio de 2018
- Cierre de base de datos: Septiembre de 2019
- Informe final estadístico: Noviembre de 2019
- Informe final: Diciembre de 2019

4. Justificación del estudio

4.1 *Antecedentes*

Las enfermedades músculo-esqueléticas son la principal causa de dolor crónico y discapacidad, afectando a cientos de millones de personas en el mundo (1). En Europa aproximadamente una cuarta parte de la población adulta se ve afectada por estos problemas que limitan sus actividades diarias (2). La prevalencia de estas enfermedades se incrementa notablemente con la edad, por el estilo de vida y la falta de ejercicio físico (moduladores epigenéticos). Las principales enfermedades músculo-esqueléticas son la

artritis ósea, artritis reumatoide, osteoporosis y la deformación de la columna vertebral, y entre las deformaciones de columna, la escoliosis constituye el tipo más común.

La Escoliosis Idiopática (EI) con una prevalencia del 4% en adolescentes y 11'3% en adultos (3), puede provocar artritis ósea, deformación progresiva, estenosis de la columna con radiculopatía, fatiga muscular, dolor crónico, problemas respiratorios y afectación psicológica (4). La escoliosis en adultos ocurre mayoritariamente cuando la escoliosis estaba ya presente en la adolescencia y progresa con los años. Otras causas menos frecuentes de escoliosis son la osteoporosis o la espondilolistesis (5).

La Escoliosis Idiopática Adolescente (EIA) es el tipo de escoliosis que con más frecuencia afecta a niños de edades comprendidas entre los 10 y los 18 años. En general, la curvatura por EIA progresa durante el periodo de crecimiento rápido del paciente. Y, aunque en muchos casos el progreso de la curvatura se enlentece significativamente cuando se alcanza la madurez esquelética, algunos, especialmente en los casos en los que la curvatura es mayor de 60°, continua el progreso durante la edad adulta. Existen muchas teorías respecto a la causa de la EIA que incluyen desequilibrio hormonal, crecimiento asimétrico y desequilibrio muscular. Sin embargo, la causa de la EIA siga siendo desconocida.

La EIA es una enfermedad multifactorial con componentes epigenéticos (6). Tanto la genética como las interacciones ambientales contribuyen al desarrollo de la enfermedad. El manejo actual de la enfermedad consiste en recomendaciones sobre cambios de estilo de vida o el ejercicio en los casos leves. En los casos moderados, se recurre al uso de corsés ortopédicos, que pueden ser utilizados durante unas pocas horas diarias o durante todo el día. Sin embargo, estos tratamientos no se aplican con el fin de curar la enfermedad, sino como métodos que intentan reducir la velocidad de progresión, por lo que el único tratamiento real consiste en la cirugía. Ésta se aplica a los casos severos, y consiste en una intervención quirúrgica para incorporar piezas metálicas que corrijan la desviación de la columna, con el riesgo que cualquier intervención conlleva. Uno de los principales problemas que tienen los clínicos especialistas es que no existe un patrón claro de la evolución de la enfermedad. De manera que algunos casos progresan rápidamente mientras que otros lo hacen muy lentamente o no llegan a progresar. Pero lo que sí es conocido es que un 10% de los pacientes evolucionan hasta considerarse graves y, que requieren cirugía, por lo que tanto los clínicos como los pacientes se enfrentan a la incertidumbre de la evolución de la enfermedad.

El diagnóstico y monitorización de la enfermedad se realiza actualmente mediante la realización de múltiples exploraciones de rayos X (2 radiografías cada 4-6 meses) y frecuentes visitas al médico especialista de columna. También se utilizan otras técnicas de imagen como la resonancia magnética, la tomografía computarizada, etc., pero el

actual “gold estándar” para el diagnóstico es la exploración radiológica. Sin embargo, los rayos X tan sólo permiten evaluar la curvatura de la columna vertebral una vez se ha producido, no es totalmente objetiva (depende de las habilidades “visuales” del especialista) y no tienen ninguna capacidad pronóstica. Por otra parte, los pacientes de escoliosis tienen mayor riesgo de cáncer y cataratas debido a la frecuente exposición a los rayos X.

Tras la evaluación radiográfica se estima el ángulo de Cobb, que es el método más difundido para la medición de las curvaturas fisiológicas o patológicas de la columna, y permite clasificar las curvaturas en leves (curvas menores de 20°), moderadas (curvas de 20° hasta 40°) o severas (curvas mayores de 50°). La catalogación de las curvas entre 40° y 50° variará según el grado de madurez esquelética del paciente, asumiendo que una vez alcanzada la madurez ósea se evalúa con la escala de Risser a partir del grado de osificación en la apófisis ilíaca, clasificando a los pacientes de 0-5. Este valor junto con el ángulo de Cobb puede orientar de cómo evolucionará un paciente. Pero es un parámetro totalmente subjetivo que puede variar incluso de clínico a clínico, por lo que proporciona poca información adicional en el pronóstico de la escoliosis y su utilidad en la práctica clínica es pobre.

Dado que no existe una técnica pronóstico válida, es necesario recurrir a repetidas radiografías para monitorizar la enfermedad, 6 radiografías como media se realizan en el primer año tras el diagnóstico, y la cifra se eleva a 28 en los 3 años posteriores al diagnóstico, lo que significa un coste económico muy alto y una sobresaturación del sistema sanitario público.

La ausencia en la práctica clínica de una técnica que permita pronosticar y monitorizar la enfermedad de una manera coste-efectiva y cómoda para los pacientes es una motivación para la búsqueda de una herramienta de predicción que permita un mejor manejo de la enfermedad.

4.2 Justificación del estudio

Se ha identificado la necesidad de disponer de una herramienta que permita el diagnóstico precoz de la enfermedad para realizar cribados en la población adolescente, y sobre todo que permita identificar aquellos casos que sufrirán una progresión rápida a estados más graves de la enfermedad, con el fin de poder programar el momento óptimo de intervención médica (7).

En un proyecto de investigación conjunto de EpiDisease S. L. y el Hospital de Universitari i Politènic La Fe de València, se identificaron varios miARNs diferencialmente presentes en la sangre de pacientes con EIA, cuyos niveles de expresión se correlacionaban perfectamente con el grado de la curvatura de la columna (8). En base a estos

biomarcadores epigenéticos EpiDisease S. L. ha desarrollado Scolipro[®], un test para el diagnóstico “in vitro” (IVD), que podría proporcionar una medida cuantitativa de la gravedad, un perfil de riesgo personalizado y el pronóstico de la enfermedad.

Estos miARNs (protegidos mediante patente europea) participan además en varias rutas implicadas en la maduración del hueso, que pueden estar alteradas desde el inicio de la enfermedad, por lo que esta prueba debería permitir el diagnóstico precoz, incluso antes de la aparición de los primeros síntomas, atendiendo al análisis de las causas genéticas y ambientales de la enfermedad. Este test IVD permitiría optimizar el tratamiento y, dada la naturaleza dinámica de los biomarcadores epigenéticos, también posibilitaría monitorizar la eficacia del mismo. Por todo ello, Scolipro[®] pondría a disposición del especialista clínico nuevos criterios para el pronóstico y el desarrollo de terapias personalizadas. El criterio diagnóstico actual de la EI se basa en la combinación de rayos X con parámetros clínicos que miden la maduración ósea, como el índice Risser; sin embargo, sólo detectan síntomas graves de la enfermedad (la curvatura de la columna vertebral), una vez que ya se han producido, y dependiendo mucho de la pericia del examinador. En cambio, Scolipro[®] permitiría diagnosticar y predecir la evolución de la enfermedad, así como monitorizar el tratamiento mediante la detección de los miARNs. Scolipro[®] tendría una amplia repercusión y beneficios en cuanto a la identificación de la población en riesgo de desarrollar una deformación severa de la columna. Además, tiene potencial para ser incluido, como herramienta de cribado mínimamente invasiva, en programas de detección precoz, lo cual es esencial para reducir las deformidades de la columna vertebral y los costes asociados al tratamiento. Scolipro[®] sería una solución efectiva en cuanto a su coste, a corto y largo plazo frente al protocolo actual de monitorización de la enfermedad (rayos X y Risser) y podría realizarse “in situ” en los laboratorios hospitalarios. Además, a largo plazo el reemplazo de la técnica para la monitorización basada en rayos X por una técnica de diagnóstico molecular in vitro, también contribuirá a disminuir el riesgo de futuros casos de cáncer de mama y endometrio asociados a la continua irradiación de estos pacientes durante el seguimiento de la enfermedad (9).

Los resultados obtenidos en este estudio permitirán construir el algoritmo para la función pronóstico del test Scolipro[®].

5. Objetivos del estudio

5.1 *Objetivo principal*

Evaluar, en ensayo a pequeña escala, el valor pronóstico del test Scolipro[®] en pacientes con EIA, analizando una firma de miARNs circulantes como biomarcadores.

5.2 Objetivo secundario

- Evaluar la validez del test (sensibilidad y especificidad), y seguridad (valores predictivos).
- Identificar las potenciales asociaciones entre las variables clínicas de los pacientes y los niveles de expresión de los miARNs seleccionados.
- Desarrollar un algoritmo de predicción para EIA.

6. Criterios de valoración

6.1 Criterios de valoración principal

Las variables principales son

- niveles de miARNs obtenidos con el kit Scolipro®
- ángulo de Cobb obtenido mediante evaluación radiográfica

6.2 Criterios de valoración secundarios

Las variables secundarias son

- niveles de miARNs obtenidos con el kit Scolipro®
- variables clínicas que puedan estar relacionadas con los niveles de miARNs (índice de Risser, peso, talla, etc.)

7. Fuente de información y ámbito

La información necesaria para llevar a cabo este estudio será:

- a) documental, datos referentes a la EIA extraídos de la historia clínica de los pacientes de los centros hospitalarios Hospital Universitari i Politècnic La Fe y Hospital Universitario Doctor Peset.
- b) experimental, niveles de expresión de los miARNs en plasma sanguíneo obtenidos del análisis de las muestras sanguíneas de los pacientes.

8. Diseño del estudio

Se trata de un estudio observacional de seguimiento prospectivo, durante 18 meses, de casos de EIA reclutados en dos hospitales de València. Además, se realizará la recogida de datos clínicos documentados desde el momento del diagnóstico (estudio retrospectivo).

8.1 Población de estudio

Pacientes diagnosticados de EIA (ángulo de Cobb $> 15^\circ$) en el Hospital Universitari i Politècnic La Fe y el Hospital Universitario Doctor Peset de València, con edades

comprendidas entre los 10 años y menores de 18 años en el momento de la inclusión en el estudio.

8.1.1 Criterios de inclusión

- Pacientes entre los 10 años y menores de 18 diagnosticados de EIA con ángulo de Cobb > 15°.
- Disponibilidad de una historia clínica que permita monitorizar la evolución clínica de la EIA.
- Firma del Consentimiento Informado (CI) del padre/ madre/ representante legal de los participantes, y en los casos en los que el menor tenga doce o más años deberá prestar su consentimiento para participar en el estudio.

8.1.2 Criterios de exclusión

- Paciente fumador.
- Pacientes con procesos infecciosos o inflamatorios en el momento de la inclusión en el estudio.
- Pacientes con patología neurológica.
- Pacientes con escoliosis de origen congénito o de etiología no idiopática.
- Pacientes embarazadas o madres lactantes.

8.2 Criterios de retirada

El padre, la madre o el representante legal o el propio participante pueden cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su atención sanitaria.

Serán criterios de retirada del paciente del estudio en los siguientes casos:

- En aquellos casos en los que los pacientes sufrieran procesos infecciosos o inflamatorios en el momento de la toma de muestras.
- Si una paciente se quedara embarazada durante el curso del estudio.

8.3 Periodo de observación

Se recogerán los datos incluidos en la historia clínica del paciente desde la fecha en la que se diagnosticó la enfermedad (EIA) hasta 12 meses (+3 meses) después de la toma de la primera muestra. Los datos de la historia clínica se contrastarán con los resultados de los análisis de las muestras sanguíneas.

8.4 Descripción del procedimiento

Al paciente se le realizarán extracciones sanguíneas y seguimiento clínico en tres momentos.

Los tres momentos del estudio (puntos de control) serán:

t₀: toma de la primera muestra

t_i: monitorización intermedia (en el mes 6 (+3 meses) después de la toma de la primera muestra)

t_f: monitorización final (en el mes 12 (+3 meses) después la toma de la primera muestra)

Las muestras sanguíneas de 8 mL serán extraídas por flebotomía en 2 tubos Vacutainer EDTA-K2 de 4 mL y serán procesadas para la separación del plasma en los centros hospitalarios, desde donde se enviarán para su almacenamiento al Biobanco del Centro de Investigación Biomédica en Red- Enfermedades Raras (CIBERER). Los investigadores solicitarán las muestras de plasma al biobanco y en las instalaciones del promotor procederán a su análisis con el “kit prototipo” de ScoliPro® para obtener los niveles de miARNs circulantes.

Los datos de la historia clínica del paciente se recogerán de forma retrospectiva desde el diagnóstico hasta la inclusión en el estudio, y de forma prospectiva desde la inclusión hasta un máximo de 12 meses tras la toma de la primera muestra del periodo prospectivo.

8.5 Determinación del tamaño de la muestra

Dado que es la primera vez que se evalúa la capacidad del test ScoliPro® para evaluar el pronóstico de la evolución de la enfermedad, no se dispone de información previa para realizar un cálculo formal del tamaño de la muestra. Por ello, el tamaño de la muestra se basa en el número de pacientes disponibles actualmente en los dos hospitales participantes en el estudio, que se estima en 50 pacientes.

9. Variables e instrumentos de medida

9.1 Variables demográficas

- Fecha de nacimiento
- Sexo
- Edad menarquía

9.2 Variables clínicas

- Edad al diagnóstico (fecha de diagnóstico)
- Antecedentes familiares de escoliosis (sí/no y parentesco en caso afirmativo)
- Fecha de las exploraciones radiológicas
- Fecha de las visitas
- Fecha de las extracciones de sangre
- Peso (Kg)
- Talla (cm)
- Lenke (se recogerá en t_0): es un sistema de clasificación de EIA que proporciona una manera de categorizar las curvas de la EIA quirúrgica(8) . Esta clasificación considera en primer lugar el patrón de curva, precisando los límites y nombres de la escoliosis según el segmento comprometido. De este modo, existen 4 segmentos importantes desde el punto de vista quirúrgico:
 - Torácico proximal: el ápex de la curva se encuentra entre el disco T2-T3 y el disco T5-56.
 - Torácico principal: el ápex de la curva se encuentra entre la sexta vértebra torácica y el plano discal T11-T12.
 - Torácico- lumbar: el ápex de la curva se encuentra entre el borde cefálico de la vértebra T12 y el borde caudal del L1.
 - Lumbar: el ápex de la curva se encuentra entre el plano discal L1-L2 y el borde caudal de la vértebra L4.

Las medidas se realizan de radiografías estándar (lateral, frontal y en flexión) y se clasifica la curvatura de escoliosis de tres maneras:

- Teniendo en cuenta si el tipo de curvatura de las tres regiones de la columna vertebral (torácico proximal, torácico y lumbar) es o no estructural.
- La modificación de columna lumbar basado en la distancia desde el centro de la columna lumbar hasta la línea media.
- La modificación torácico sagital basada en la desviación lateral de la curvatura de la región torácica.

Este sistema combina el tipo de curva (1-6) con la modificación lumbar (A, B, C) y la modificación sagital torácica (-, N, +).

- Risser (variable escala 0-5) (10, 11): es una clasificación que estima el grado de madurez esquelética basado en el nivel de osificación y la fusión de la apófisis de la cresta ilíaca. Es esencial en el planteamiento de cirugía correctiva de escoliosis. La clasificación es:
 - Fase 0: no hay osificación a nivel de la apófisis de la cresta ilíaca.

- Fase 1: apófisis por debajo del 25% de la cresta ilíaca.
- Fase 2: apófisis por encima del 25%- 50% de la cresta ilíaca.
- Fase 3: apófisis por encima del 50%-75% de la cresta ilíaca.
- Fase 4: apófisis > 75% de la cresta ilíaca.
- Fase 5: osificación completa y fusión de la apófisis de la cresta ilíaca.
- Ángulo de Cobb (°) obtenido mediante evaluación radiográfica:
 - Cobb torácico
 - Cobb lumbar
 - Curva mayor
- Gibas (°) obtenidas mediante evaluación radiográfica:
 - Cifosis (T4-T12)
 - Lordosis (T12-S1)
- Incidencia pélvica (°)
- Inclinación pélvica (°)
- Plomada:
 - Equilibrio coronal (mm)
 - Equilibrio sagital (mm)
- SRS-22: cuestionario de "Scoliosis Research Society" que contiene 22 preguntas que cubren ámbitos: función/ actividad (5 preguntas); dolor (5 preguntas); autopercepción (5 preguntas); salud mental (5 preguntas); y satisfacción con el tratamiento (2 preguntas). Cada pregunta se evalúa desde 1 (muy mal) a 5 (muy bien). La puntuación obtenida es un instrumento válido para valorar la calidad de vida en pacientes con EI (12).
- Tratamiento (sí/no)
- Tipo de tratamiento (corsé, programa de ejercicio físico)
- Fecha inicio de tratamiento
- Fecha fin de tratamiento
- Cumplimiento del tratamiento, evaluado mediante una pregunta de tipo sí/no y el grado de cumplimiento, definido como:
 - El número de horas/día (pautadas y realizadas) que el paciente lleva corsé
 - El número de horas/semana (pautadas y realizadas) que el paciente realiza ejercicio físico

9.3 Variables relativas al test ScolioPro®

- Niveles de expresión de miARNs cuantificados con el kit ScolioPro®.

9.4 Otras variables

- Consumo de tabaco

9.5 Recogida de datos

9.5.1 Recogida de datos clínicos

La información que permite evaluar los objetivos primario y secundario se recogerá mediante un cuaderno de recogida de datos electrónico (e-CRD) además de los resultados de la evaluación de las muestras solicitadas al biobanco.

Los datos clínicos se recogerán a partir de la información registrada en la historia clínica (datos previos y actuales), que los investigadores del estudio facilitarán y que no requerirá la participación activa de los pacientes (entrevista o pruebas específicas del protocolo). Los datos serán disociados de manera que la información recogida por el promotor no incluirá ningún dato de carácter personal.

El promotor se compromete al cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal y al Real Decreto (RD) que la desarrolla (RD 1720/2007) así como el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD). Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código, de manera que no incluya información que pueda identificar al paciente y sólo el médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con los del paciente y con su historia clínica. Por lo tanto, la identidad del paciente no será revelada a persona alguna salvo excepciones en caso de urgencia médica o requerimiento legal. El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los participantes se ajustarán a lo dispuesto en esta ley. El promotor adoptará las medidas pertinentes para garantizar la protección de la privacidad de los pacientes y no permitirá que sus datos se crucen con otras bases de datos que pudieran permitir su identificación.

Tanto los datos clínicos a los que tenga acceso el promotor como las muestras depositadas en el biobanco serán codificados de acuerdo a la legislación vigente y según código de EpiDisease (las muestras también serán recodificadas por el biobanco).

Se codificará de la siguiente manera: el estudio se identifica con un código de tres caracteres alfanuméricos (letra inicial de la empresa y el número consecutivo del estudio en cuestión -E01-); el centro investigador será identificado con un código de dos dígitos, y cada paciente incluido por este centro será identificado por un código numérico de tres dígitos, empezando por el número 001, de forma que en la base de datos central cada

paciente quedará identificado por un código compuesto por el código del estudio, el código del centro investigador y el número de paciente (por ejemplo, E01.01.001). En ningún caso incluirá datos que permitan su identificación.

Se registrarán en el e-CRD los datos que, siguiendo las directrices de este protocolo, estén disponibles en la historia clínica del paciente.

Exterior realizará la grabación de los datos registrados en los e-CRD en una base de datos propiedad de EpiDisease S. L., promotor del estudio.

Una vez finalizado el registro de los datos del último paciente del estudio y tras la revisión de los datos por parte del Departamento de Gestión de datos se procederá al cierre de la base de datos, siempre y cuando se hayan solucionado las posibles discrepancias encontradas.

Una vez cerrada la base de datos se transferirá a la Unidad de bioinformática y bioestadística de EpiDisease S.L

9.5.2 Recogida de datos de los análisis de las muestras.

Las muestras guardadas en Biobanco serán solicitadas por el promotor para ser evaluadas en las instalaciones de EpiDisease.

Tras la evaluación se generará una base de datos con los niveles de miARNs obtenidos con el kit ScoliPro® y estos datos serán incluidos en el e-CRD.

(Ver sección [12.1.1](#) para más información sobre las muestras biológicas).

10. Análisis estadístico

10.1 Aspectos generales del análisis estadístico

La capacidad de una prueba diagnóstica viene dada por su sensibilidad (probabilidad de clasificar como positivo respecto a una determinada condición a un paciente que lo es, es decir, verdaderos positivos) y especificidad (probabilidad de clasificar como negativo respecto a esa misma condición a un paciente que lo es, es decir, verdaderos negativos). La curva ROC (Receiver Operating Characteristic) permite evaluar la relación entre sensibilidad y especificidad para cada posible valor umbral de la prueba diagnóstica considerada, con respecto a una prueba considerada de referencia llamada "gold standard".

Por otra parte, los valores predictivos (positivo y negativo) son las probabilidades de presentar o no la condición en estudio una vez conocido el resultado de la prueba

diagnóstica, y son de utilidad porque dependen de la prevalencia de la condición en estudio en la población estudiada.

10.2 Aspectos específicos del análisis estadístico

Se evaluará la relación entre los niveles de miARNs y las variables clínicas.

Posteriormente se procederá a la construcción de modelos que permitan relacionar la evolución presentada por los pacientes con los niveles de miARNs cuantificados, con el fin de establecer el riesgo evolutivo de los pacientes de EIA. En función de los resultados obtenidos se calcularán sensibilidad, especificidad, curva ROC, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para el modelo seleccionado, considerando como “gold standard” el ángulo de Cobb obtenido mediante evaluación radiográfica.

11. Aspectos éticos

El estudio se llevará a cabo de acuerdo con los requerimientos expresados en RD 1662/2000 (transposición de la directiva 98/79/CE) sobre productos sanitarios para diagnóstico “in vitro” y la Ley 14/2007 de 3 de julio, de Investigación biomédica, las normas internacionales relativas a la realización de estudios epidemiológicos, recogidas en las *International Guidelines for Ethical Review of Epidemiological Studies* (Council for the International Organizations of Medical Sciences –CIOMS-, Geneva, 2002), así como la Declaración de Helsinki (en su última versión). Ésta define los principios que deben ser respetados escrupulosamente por todas las personas implicadas en esta investigación.

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los pacientes participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal, así como el RGPD 2016/679 del 27 de abril de 2016.

Como consideraciones generales, todas las partes implicadas en este estudio, promotor, CRO y equipo investigador aceptan las normas éticas nacionales e internacionales sobre investigación.

El protocolo será sometido a la evaluación del Comité Ético (CE), previamente al inicio de la inclusión de los pacientes. Cualquier dato requerido por el protocolo podrá estar sujeto a auditorías por el promotor, y/o autoridades competentes, pero la confidencialidad de los datos será siempre condición indispensable, y el uso de los datos será única y exclusivamente para los fines protocolizados y comunicados a las autoridades.

Al ser un estudio de tipo observacional está exento de la obligatoriedad de suscripción de un seguro.

11.1 Evaluación beneficio-riesgo

En el presente estudio, además de un registro de datos, se analizan muestras de sangre de los pacientes, por lo que el riesgo se limita al relacionado a la venopunción para obtener dicha muestra, siendo el más frecuente la aparición de un pequeño hematoma en la zona de punción que suele desaparecer transcurridos 1 o 2 días y en ocasiones pueden provocar hemorragias, molestias, infecciones y/o dolor en el punto de la extracción. El paciente también puede sentirse mareado.

ScoliPro® podría proporcionar un método de diagnóstico precoz y pronóstico de la evolución enfermedad que simplificaría la monitorización, optimizando así las alternativas terapéuticas y permitiendo la prevención de la EIA.

Los beneficios para los clínicos pueden incluir:

- a) Capacidad de pronóstico de evolución de la enfermedad a escoliosis severas.
- b) Protocolos más efectivos basados en la detección precisa y el perfil de riesgo del paciente.
- c) Profundización en el conocimiento del desarrollo de la escoliosis mediante la correlación y el análisis de parámetros cuantificables.
- d) Medida de parámetros objetivos para evaluar la progresión de la enfermedad.
- e) Diagnóstico precoz, personalización y monitorización del tratamiento.
- f) Reducción del número de visitas de pacientes y optimización de la gestión clínica.
- g) Intervenciones quirúrgicas más tempranas y sencillas, con menos implantes, menor coste y menor riesgo para el paciente.
- h) Potencial de desarrollo e investigación de nuevos fármacos y terapias mediante la correlación de medidas y resultados de múltiples pacientes, cuando estén disponibles en el futuro.

Los beneficios para el sistema sanitario:

ScoliPro® disminuiría el coste de diagnóstico y tratamiento al: i) reducir el número de visitas al hospital, ii) hacer menor uso de rayos X, iii) disminuir el uso de corsés y iv) facilitar la cirugía en estadios tempranos de la EIA, con menor instrumentación y riesgo.

Los beneficios para los pacientes:

Los pacientes recibirían un tratamiento personalizado basado en su perfil de riesgo lo que representa menos tiempo empleado en las visitas al hospital, menos radiación por rayos

X y eliminación de riesgos asociados, los corsés solo se usarían en caso de mal pronóstico, los ejercicios físicos serían prescritos adecuadamente y la toma de decisión crítica en relación a la cirugía espinal sería informada y soportada por datos cuantitativos. Los beneficios para los pacientes incluirían:

- a) Mejor calidad de vida, mayor movilidad, más confort y menos estrés.
- b) Menor carga para los familiares mediante prevención y menos visitas al hospital.
- c) Menos exploraciones de rayos X, reduciendo los riesgos asociados.
- d) Decisión informada del paciente y familiares en relación con el tratamiento, basándose en parámetros biológicos cuantitativos.
- e) Monitorización de la progresión de la enfermedad y el tratamiento.
- f) Reducción de visitas al hospital, corsés e intervenciones quirúrgicas.
- g) Identificación de riesgo en familiares y medicina preventiva.

11.2 Hoja de información y consentimiento informado

Al tratarse de un estudio en el que participan menores, antes de realizar cualquier procedimiento del estudio, el investigador principal o la persona en quien delegue se encargará de facilitar la hoja de información y de recoger el CI del estudio del padre/madre/representante legal de los participantes en el estudio. El CI contempla la toma de las muestras y su inclusión en una colección de muestras en el biobanco CIBERER específica para su uso en este estudio. En los casos en los que el menor tenga 12 o más años, también se obtendrá el asentimiento del menor tras proporcionarle una hoja de información al paciente y CI adaptada a su nivel de entendimiento.

Si durante el curso del estudio, el paciente alcanzase su mayoría de edad, se le solicitaría que firmase la hoja de información al paciente y CI correspondiente para confirmar su voluntad de continuar participando en el estudio.

En el caso de que el paciente y/o su padre/madre/representante legal quisieran que las muestras sobrantes pudieran ser utilizadas para futuras investigaciones, se podría autorizar la cesión de las mismas para su almacenamiento en régimen de colección de biobanco al Biobanco CIBERER. Para ello, se debería firmar un CI adicional facilitado por el Biobanco y que ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) de la Dirección General de Salud Pública y Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CEIC DG SP/ CSISP).

11.3 Confidencialidad de los datos

Con el fin de garantizar la confidencialidad de los datos del estudio, sólo tendrán acceso a los mismos el investigador y su equipo de colaboradores, el CEIC, las autoridades sanitarias pertinentes, los representantes del promotor y la CRO.

Los datos del estudio estarán a disposición de las autoridades sanitarias (AEMPS, Comité Ético y organismos reguladores de las comunidades autónomas) en caso de auditoría y/o inspección.

El contenido del e-CRD, así como los documentos generados durante el estudio serán protegidos de usos no permitidos por personas ajenas a la investigación y, por tanto, serán considerados estrictamente confidenciales.

En el e-CRD los datos serán disociados de manera que la información recogida en el mismo no permita la identificación del paciente. Cada paciente será registrado en el e-CRD con un código alfanumérico consecutivo.

En la base de datos del Biobanco CIBERER, los datos serán disociados de manera que la información recogida en el mismo no permita la identificación del paciente.

Los datos personales del investigador, y de su equipo investigador, que se incluyan en el estudio serán tratados por el promotor y la CRO conforme a las disposiciones de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, así como el RGPD 2016/679 de 27 abril de 2016, siguiendo las directrices e instrucciones del responsable del fichero, EpiDisease S. L. y con la exclusiva finalidad de llevar a cabo las gestiones necesarias para el desarrollo y buen fin del estudio.

11.4 Interferencia con los hábitos de prescripción del médico

Este estudio se centra en la evaluación de la función pronóstico del test ScolioPro®, por lo que no interfiere con los hábitos de prescripción del médico. Además, es un estudio observacional en el que no se valoran los tratamientos que se han prescrito al paciente o los que actualmente recibe.

12. Consideraciones prácticas

12.1 Plan de trabajo

El CE realizará la evaluación del protocolo. Una vez se consiga su aprobación, se firmará un acuerdo con cada centro y se procederá al inicio del estudio en los centros participantes.

La información se recabará de las historias médicas de los pacientes, así como de la información obtenida del análisis de las muestras sanguíneas. Cada investigador participante en el estudio incluirá todos los pacientes cuya historia cumpla todos los criterios de inclusión y ninguno de exclusión especificados.

El periodo de introducción de datos clínicos de los pacientes que cumplen los criterios de elegibilidad será desde el momento en que se diagnosticó la enfermedad hasta aproximadamente 18 meses después de la primera toma de muestra (ver [figura 1](#)).

Durante los 18 meses de recogida de datos con carácter prospectivo, habrá 3 puntos de seguimiento o control del paciente, con la siguiente distribución temporal:

- t_0 : toma de la primera muestra
- t_i : monitorización intermedia (en el mes 6 (+ 3 meses) después de la toma de la primera muestra)
- t_f : monitorización final (en el mes 12 (+ 3 meses) después de la toma de la primera muestra)

Durante el periodo de recogida de datos con carácter retrospectivo, cada paciente tendrá un número de visitas distinto dependiendo de la historia clínica previa desde el diagnóstico.

En cada centro una vez se haya confirmado que un paciente cumple los criterios de selección del estudio, podrán registrarse los datos definidos en este protocolo.

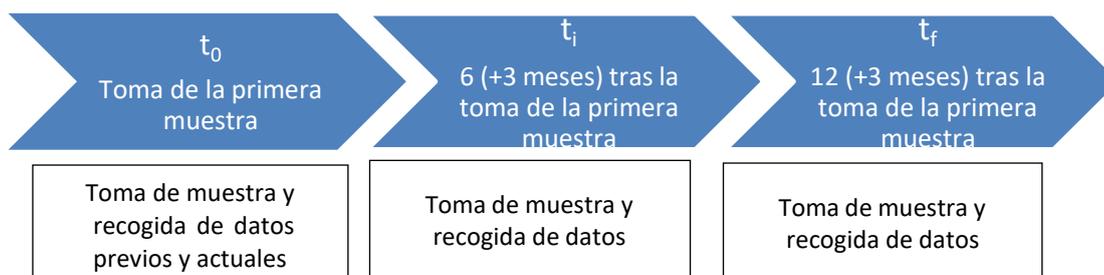


Figura 1. Esquema del estudio.

12.1.1 Muestras biológicas

Durante el estudio se realizarán 3 extracciones sanguíneas de aproximadamente 8 ml cada una. Para asegurar que las muestras son recogidas adecuadamente y que sean útiles para su evaluación con el kit ScoliPro®, un técnico de EpiDisease S. L. entrenará al personal del hospital encargado de la extracción.

La extracción de la muestra sanguínea será realizada según el procedimiento regulado por el PNT de EpiDisease con código ID.G.001 ([Anexo I](#)) por parte del personal del centro sanitario correspondiente. Las muestras serán codificadas según PNT de EpiDisease

D.002. ([Anexo II](#)). Posteriormente se procederá a la separación del plasma según PNT de EpiDisease con código ID.G.002 ([Anexo III](#)) por parte del personal de EpiDisease en las instalaciones del centro sanitario. Las muestras recogidas se depositarán en el Biobanco CIBERER en una colección de muestras específica para el estudio.

La extracción de los miARNs a partir del plasma se realizará con el kit miARNeasy Plasma/serum Kit (Qiagen) en las instalaciones del promotor según el PNT de EpiDisease con código ID.T.001 ([Anexo IV](#)). Para la cuantificación de los niveles de miARNs se realizará de acuerdo a los PNTs de EpiDisease con código ID.PE.001 ([Anexo V](#)) e ID.T.002 ([Anexo VI](#)) en las instalaciones del promotor.

En el caso de que el paciente y/o su padre/madre/ representante legal quisieran que las muestras sobrantes pudieran ser utilizadas para futuras investigaciones, se podría autorizar a la cesión de muestras las mismas al Biobanco CIBERER para su almacenamiento en régimen de colección de biobanco. Para ello, se debería firmar el un CI adicional facilitado por el Biobanco. En caso contrario, las muestras sobrantes serán destruidas tras su análisis.

12.2 Procedimiento de comunicación de reacciones adversas

En este estudio se pretende validar un kit que analiza muestras de sangre de los pacientes, por lo que el paciente no entrará en contacto directo con el producto sanitario, no existiendo por ello riesgo de que se produzcan reacciones adversas, por lo que no sería necesario comunicarlas.

12.3 Uso de medios electrónicos

Las bases de datos, servidores, programas y procedimientos necesarios para el tratamiento de los datos registrados en el e-CRD cumplen con las buenas prácticas en seguridad de la información y legislación aplicable. Concretamente, los e-CRD de Experior cumplen con la norma 21 CFR Parte 11 y el Anexo 11 de GMP de la Unión Europea.

A cada investigador principal, colaborador y coordinador del estudio se le hará entrega de forma confidencial un nombre de usuario y una contraseña. Estos códigos están considerados confidenciales e intransferibles y están sometidos a las mismas normas de confidencialidad que el resto de los documentos, incluido el propio protocolo.

Es responsabilidad de los investigadores mantener en secreto sus contraseñas y no revelarlas a terceras partes.

El promotor del estudio y sus representantes tendrán códigos de acceso exclusivamente para la lectura de los e-CRD, también confidenciales. En ningún momento podrán modificar la información registrada en ellos por los investigadores.

Los datos registrados por el investigador en el e-CRD serán revisados de acuerdo al Plan de Gestión de Datos y se generarán las *queries* necesarias para facilitar el correcto y completo registro de los datos.

12.4 Informe final de resultados

La presentación del informe final se realizará de acuerdo con lo establecido en la Ley 14/2007, de 03 de Julio, de Investigación Biomédica.

12.5 Difusión de los resultados

El investigador coordinador del estudio y el promotor serán co-responsables de la elaboración del informe final del estudio. El informe final definitivo habrá de ser remitido a los Comités Éticos de la Investigación correspondientes.

Los resultados de la investigación se comunicarán a los participantes, siempre que lo soliciten.

Los investigadores deberán hacer públicos los resultados generales de las investigaciones una vez concluidas.

Una vez finalizado el informe final del estudio, los resultados del estudio podrán ser comunicados en cuantos congresos científicos nacionales e internacionales el investigador coordinador considere oportunos siempre que se haya obtenido previamente el consentimiento expreso y por escrito de EpiDisease S. L.

En todas las publicaciones a las que dé origen el presente estudio se hará mención expresa a EpiDisease S. L. como promotor del estudio.

13. Responsabilidades del estudio

13.1 Responsabilidades del promotor

- Aprobar el contenido del presente protocolo y cualquier modificación, en el que se detallan las características del estudio a desarrollar. La firma del protocolo supone la aceptación de todos los términos descritos en él.
- Remitir el protocolo a los CEI correspondientes y no iniciar el estudio hasta obtener su aprobación.
- Suministrar a los investigadores el protocolo y los demás materiales del estudio.

- Presentar el protocolo del estudio y el informe final y comunicar, en su caso, la interrupción y las razones de la misma.
- Respetar la confidencialidad de los datos de los sujetos participantes en el estudio.
- Difundir los resultados del estudio.
- Facilitar las auditorías y las inspecciones de las autoridades sanitarias.

13.2 Responsabilidades de los investigadores

- Aceptar los términos del protocolo y cualquier modificación del mismo. La firma del protocolo supone la aceptación de todos los términos descritos en él.
- Recoger, registrar y notificar los datos de forma correcta, en los plazos especificados en el protocolo, respondiendo de su actualización y calidad ante las auditorías oportunas.
- Respetar la confidencialidad de los datos de los sujetos participantes en el estudio.
- Facilitar las auditorías del promotor y las inspecciones de las autoridades sanitarias.

14. Bibliografía

1. Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bulletin of the World Health Organization*. 2003;81(9):646-56.
2. Lidgren L, Smolen J, Bentley G, Delmas P, Woolf A, Åkesson K, et al. European action towards better musculoskeletal health: a public health strategy to reduce the burden of musculoskeletal conditions. Lund, Sweden: The Bone & Joint Decade Department of Orthopedics University Hospital. 2005.
3. Schwab F, Dubey A, Gamez L, Fegoun ABE, Spine KH, Undefined. Adult scoliosis: prevalence, SF-36, and nutritional parameters in an elderly volunteer population. *journalslwwcom*. 2005;30(9):1082-5.
4. Li M, Shen Y, Gao Z-l, Fang X-t, Xie Y, Wang C-f, et al. Surgical Treatment of Adult Idiopathic Scoliosis: Long-term Clinical Radiographic Outcomes. *Orthopedics*. 2011;34(3):180-.
5. Korbel K, Kozinoga M, Stoliński Ł, Kotwicki T. Scoliosis Research Society (SRS) Criteria and Society of Scoliosis Orthopaedic and Rehabilitation Treatment (SOSORT) 2008 Guidelines in Non-Operative Treatment of Idiopathic Scoliosis. *Polish orthopedics and traumatology*. 2014;79:118-22.
6. Burwell RG, Dangerfield PH, Moulton A, Grivas TB. Adolescent idiopathic scoliosis (AIS), environment, exposome and epigenetics: a molecular perspective of postnatal normal spinal growth and the etiopathogenesis of AIS with consideration of a network approach and possible implications for medical therapy. *Scoliosis*. 2011;6(1):26.
7. García-Giménez JL, Rubio-Belmar PA, Peiró-Chova L, Hervás D, González-Rodríguez D, Ibañez-Cabellos JS, et al. Circulating miRNAs as diagnostic biomarkers for adolescent idiopathic scoliosis. *Scientific Reports*. 2018;8(1):2646-.
8. Lenke LG. Lenke classification system of adolescent idiopathic scoliosis: treatment recommendations. *Instructional course lectures*. 2005;54:537-42.
9. Bone CM, Hsieh GH. The risk of carcinogenesis from radiographs to pediatric orthopaedic patients. *J Pediatr Orthop*. 2000;20(2):251-4.
10. Hacquebord JH, Leopold SS. In brief: the Risser classification: a classic tool for the clinician treating adolescent idiopathic scoliosis. 2012.
11. Bagó J, Pérez-Gruoso FJS, Les E, Hernández P, Pellisé F. Minimal important differences of the SRS-22 Patient Questionnaire following surgical treatment of idiopathic scoliosis. *European Spine Journal*. 2009;18(12):1898-904.
12. Bago J, Climent JM, Ey A, Perez-Gruoso FJ, Izquierdo E. The Spanish version of the SRS-22 patient questionnaire for idiopathic scoliosis: transcultural adaptation and reliability analysis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2004;29(15):1676-80.

Anexo I: PNT de EpiDisease ID.G.001 OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUINEAS PARA EXTRACCIÓN DE miARNs.

INSTRUCCIÓN DE TRABAJO OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUINEAS PARA EXTRACCIÓN DE miARNs.

Todo el procedimiento se realiza con guantes, y bata según normas de seguridad del laboratorio de análisis clínico

1. Se verifica la disponibilidad de todo el material requerido para la extracción:
 - Algodón.
 - Batea.
 - Antiséptico (etanol (60-90 %), ó propan-1-ol (60-70 %) ó propan-2-ol/isopropanol (70-80 %).
 - Tubo BD Vacutainer® con EDTA-k2 4 mL, Aguja I.V calibre 21-22G. (2 por paciente)
 - Ligadura.
 - Esparadrapo o tiritas.
 - Guantes para protección en la manipulación
 - Gradillas para tubos de extracción sanguínea.
 - gradilla para eppendorf
 - Etiquetas identificativas.
 - Contenedor de objetos punzantes.
 - Contenedor de muestras para traslado refrigerado (hielo)
 - consentimiento informado
 - modelo de registro
2. Se identifica al paciente (cotejar su número de Historia Clínica) y se verifica si se ha firmado el consentimiento informado:
 - a. por parte de paciente (mayor de edad)
 - b. parte de pacientes con edades de 12 a 18, no incluida la última) y madre padre/representante legal del paciente
 - c. por parte de madre padre/representante legal del paciente menor de edad.

NOTA: De no cumplir el consentimiento no se procede al muestreo.
3. Se interroga sobre cumplimiento del ayuno, toma de suplementos vitamínicos y medicación. Se llenan el registro con esos datos. La extracción se hace con el paciente preferiblemente sentado, de no ser así se anota en incidencias en el registro de datos.
4. Se selecciona la zona de inserción de la aguja por palpación con el dedo índice, palpando con suavidad y firmeza. Las venas tienen una mayor consistencia esponjosa y rebotará bajo la presión del dedo. Las arterias se encuentran a mayor profundidad y palpitan. Los tendones están duros y son resistentes a la presión.
5. Se aplica el torniquete entre 7'5 y 10 cm por encima del punto de punción.
6. Se coloca el brazo hiperextendido de manera que la mano este más baja que el codo.
7. Se confirma el punto de punción.
8. Se desinfecta el área con torunda embebida en antiséptico, aplicándolo de forma circular desde el interior hacia el exterior y se dejar secar al aire.
9. Se confirma el área está seca antes de realizar la venopunción ya que si el antiséptico contacta la sangre puede causar hemólisis.
10. Se punciona la vena y colecta la sangre en sendos tubos BD Vacutainer®-EDTA-k2 de 4ml, dejándola deslizar por la cara interna hasta completo llenado del tubo.

11. Se libera el torniquete, se pide al paciente que abra la mano

NOTA: Es muy importante cumplir los requisitos en la recolección, ya que si la sangre cae al fondo puede producir espuma con hemólisis y si no se toma todo el volumen no se cumple la proporción adecuada de sangre con aditivos.

12. Se coloca gasa o algodón sobre la punción sin presionar y se retira la aguja con un movimiento rápido y suave hacia atrás.
13. Se presiona la gasa sobre el punto de punción durante al menos un minuto, manteniendo el brazo recto.
14. Se desecha el material de extracción en un contenedor apropiado.
15. Se coloca una tirita estéril sobre la punción y se despide al donante.
16. Se voltea el tubo suavemente 8 veces para que la sangre se mezcle con el anticoagulante.

NOTA: No agitar de manera brusca ya que podría provocar la hemólisis. Mezclados insuficientes o tardíos puede originar resultados analíticos inexactos.

17. Se identifican los tubos con la etiqueta del número de HC, y se colocan en gradilla.
18. Se rellenan los datos del modelo de registro destinado al efecto, asignando un código a cada muestra-paciente según PNT de EpiDisease (Anexo1).
19. Se mantienen las muestras en posición vertical, y a temperatura ambiente, hasta su procesamiento en un margen de 2 horas.

NOTA: De no ser así, y preveer que el envío o procesamiento sobrepasará las 2 horas postextracción se conservarán las muestras a 4 grados y se enviarán en hielo Durante el envío se debe evitar agitar o provocar movimientos bruscos. El contenedor refrigerado se etiqueta con la siguiente advertencia: MUESTRAS BIOLÓGICAS. NO

Anexo II: de EpiDisease D.002. METODOLOGÍA PARA LA CODIFICACIÓN DE DOCUMENTOS Y MUESTRAS

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO METODOLOGÍA PARA LA CODIFICACIÓN DE DOCUMENTOS Y MUESTRAS

PROCEDIMIENTO

Codificación

Identificación de Estudio

1 Los estudios se identifican con código formado por tres conjuntos separados entre sí por puntos, (X.XX.XX):

- el **primer conjunto** constituido por un carácter, la letra E mayúscula que identifica la empresa EpiDisease (E.XX.XX)
- el **segundo conjunto** constituido por dos caracteres deberá indicar el orden consecutivo de estudio, Ejemplo: (E.01)
 - 01 Scolipro
 - 02 EpiAging
- el **tercer conjunto** constituido por dos caracteres que deberá indicar el centro de donde provienen las muestras, Ejemplo:
 - 01 Hospital La Fe, València
 - 02 Hospital Dr Peset 02
 - 03 Hospital de Granada
 - 04 Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona

6.5 Identificación de las muestras

6.5.1 Las muestras se identifican mediante un código formado por 5 conjuntos separados entre sí por puntos,

- el **primer conjunto** está constituido por tres caracteres del código del estudio al cual pertenece la muestra Ejemplo: E.01.01
- el **segundo conjunto** está constituido el número de orden consecutivo de la muestra (E.01.01.003)
- el **tercer conjunto** está constituido por un carácter numérico que indica el tiempo de muestreo (1, 2,3) Ej de primer muestreo E.01.01.003.1
- el **cuarto conjunto** está constituido por un carácter numérico que indica las réplicas de una misma muestra Ej réplica 4 E.01.01.003.1.4

Empresa Centro
(EpiDisease)proveedor Tiempo


E.01.02.003.1.4
Estudio Muestra Alicuota

Anexo III: PNT de EpiDisease ID.G.002 OBTENCIÓN Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE PLASMA PARA ANÁLISIS DE miARNs

INSTRUCCIÓN DE TRABAJO OBTENCIÓN Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE PLASMA PARA ANÁLISIS DE miARNs

Todo el procedimiento se realiza con guantes, gafas y bata sanitaria acorde a las normas de seguridad del Hospital

1. Se recepciona el contenedor con muestras sanguíneas procedentes del personal de enfermería del servicio o del laboratorio encargado de la extracción, acompañado del registro de Datos: Muestreo Sanguíneo para extracción de miARNs
2. Se verifica disponibilidad y adecuación del material necesario para procesamiento inmediato de la sangre.
3. Se comprueba hora de extracción, y condiciones de conservación anotadas en registro de Datos: Muestreo Sanguíneo para extracción de miARNs
 - si las muestras están a temperatura ambiente y el intervalo entre la hora de extracción y el comienzo del procesamiento es de más de 2 horas no se realiza el procesamiento
 - si las muestras están en hielo y el intervalo entre la hora de extracción y el comienzo del procesamiento es de más de 24 horas no se realiza el procesamiento
4. Se registra hora de recepción y hora de inicio del procesamiento (modelo de Registro adjuntado REGISTRO DE DATOS: OBTENCIÓN Y ALMACENAJE DE MUESTRAS DE PLASMA PARA ANÁLISIS DE miARNs
5. Se rotulan los tubos de 15 ml y eppendorf destinados al procesamiento de las muestras con el código EpiDisease correspondiente
6. Se colocan los tubos Vacutainer en la centrífuga (con un rotor horizontal y cabeza basculante) y se deshabilita la función de freno de la centrífuga para evitar que se rompa la capa de células
7. Se centrifuga el tubo de sangre 10 min. a 1.600xg a temperatura ambiente. Al retirar el tubo de la centrífuga, tener cuidado para evitar que se mezclen las fases. Con esta primera centrifugación se consigue separar el plasma de la fracción celular de la sangre. Encontraremos en el tubo 3 fases:
 - La fracción superior, con aspecto claro y transparente, de color amarillo corresponde al plasma.
 - La fase intermedia, que es muy fina y de color blanquecino o gris claro, es donde encontramos los leucocitos
 - La fracción inferior, de color rojo oscuro, corresponde a los eritrocitos.
8. Se aspira cuidadosamente con pipeta el plasma (fase superior amarilla) y se transfiere a un tubo de 15 ml estéril. No tocar con la pipeta la fase intermedia y evitar arrastrarla al tubo nuevo
9. Se centrifuga el material transferido durante 15 min, a 2500xg a temperatura ambiente.
10. Se toma una alícuota del sobrenadante para medir la absorbancia a 414 y 385 nm
11. Si la DO es menor que 0,2 se recupera el sobrenadante sin tocar el pellet y se hacen alícuotas de 500 µL en tubos de 1.5 mL estériles libres de ARNasa hasta agotar plasma
12. Se codifican los tubos según sistema de codificación aprobado por EpiDisease (PNT de Codificación)
Nota: Si la densidad óptica (DO) es mayor de 0.2, la muestra será rechazada para análisis de miARNs en este estudio. El sobrenadante de estas muestras se conservará en Biobanco para otros análisis
13. Se envían las muestras en nieve carbónica a Biobanco Ciberer (el tiempo de transporte no deberá exceder las 24h).
14. De no enviarse se conservan a -80°C hasta su envío.

Anexo IV: PNT de EpiDisease ID.T.001 EXTRACCIÓN DE miARNs DE MUESTRAS DE PLASMA/SUERO CON EL KIT miRNeasy SERUM/PLASMA KIT (QIAGEN)

INSTRUCCIÓN DE TRABAJO EXTRACCIÓN DE miARNs DE MUESTRAS DE PLASMA/SUERO CON EL KIT miRNeasy SERUM/PLASMA KIT (QIAGEN)

Se realiza todo el procedimiento con bata, guantes, mascarilla acorde a normas de seguridad de EpiDisease. Durante el proceso con cloroformo (triclorometano, CHCl₃) se aconseja usar guantes de polivinilo y campana de extracción (si no se dispone de ella, utilizar máscara con filtro para orgánicos del tipo Ax).

OPERACIONES PRELIMINARES

Estas operaciones se realizan el día previo al proceso de extracción

1. Se verifica disponibilidad de material acorde al número de muestras a procesar

Material	Almacenaje	Nº Vol/muestra	N muestras Ej: 12
Columnas RNeasy® MinElute® Spin Columnne (proporcionadas por el kit)	4º	1	12
Tubos de 2 mL	TA	1	12
Tubos de 1,5 mL libres de ARNasa	TA	4 + 1 del kit	48 (+12 del kit)
Puntas con filtro 1 mL Puntas con filtro de 20-200 µL	TA	7 3	Aprox. 40 Aprox. 40
Qiazol	TA protegido luz	1 mL	12 mL
Cloroformo (CHCl ₃)	TA protegido luz	200 µL	2,4 mL
Etanol absoluto	TA	900 µL	10,8 mL/muestras aprox 83 mL para preparar tampones y Etanol 80%
Etanol 80%	TA	500 µL	6 mL
Tampón RWT (proporcionado por el kit)	TA	700 µL	8,4 mL
Tampón RPE (proporcionado por el kit)	TA	500 µL	6 mL
Agua libre de ARNasa	TA	25 µL	300 µL/muestras aprox. 2 mL para preparar Etanol 80%
Pipetas de 10 mL estéril *	TA	1	1
Pipetas de 25 mL estéril *	TA	1	1

* opcional, se usa solo para el paso de reconstitución de los tampones del kit (paso 2)

2. Se añade etanol absoluto a los tampones proporcionados por el kit según lo indicado en la botella:
 - o A tampón RPE (11 mL) se adiciona 44 mL (4 veces el volumen del tampón).
 - o A tampón RWT (15 mL) se adiciona 30 mL (2 veces el volumen del tampón).
3. Se marca la casilla de la tapa que indica el tampón está reconstituido y se rotula con la fecha (estable por 9 meses a partir de ese momento).
4. Se prepara etanol al 80 % a partir de etanol absoluto y agua libre de ARNasa. Se rotula el frasco, incluyendo la fecha de preparación.
5. Se prepara etanol al 70 %, a partir de etanol absoluto y agua bidestilada, se rotula el frasco (uso como desinfectante).
6. Se anota en el registro de reactivos el volumen de etanol consumido.

7. Se prepara o confirma la existencia de tubos compensadores para las etapas de centrifugación (tubos de 1,5 con diferentes volúmenes, columnas y tubo colector de 2 ml con diferentes volúmenes).
8. Se rotulan en tapa y lateral 4 tubos estériles y libres de RNAsa y la columna (proporcionada por el kit de extracción de RNA) con numero de muestra
9. Se rotula el Tubo de 1,5 mL proporcionada por el kit con código EpiDisease y fecha.

PROCEDIMIENTO

1. Se limpia zona de trabajo con alcohol al 70% y con agente RNaseZAP™ cleaning agent para eliminar ARNasa.
2. Se pasa un papel humedecido y luego otro seco (eliminar restos de RNaseZAP™).
3. Se selecciona 4°C en centrifuga refrigerada (MPW-260R), y se pone en funcionamiento para que alcance la temperatura.
4. Se dispone gradilla(s) con capacidad suficiente para ubicar columnas y tubos para el número de muestras a procesar. Considerar que cada muestra necesita una columna, y 5 tubos de 1,5 mL (Ej. 12 muestras implican 72 pozos).
5. Se descongelan las muestras de plasma (aprox. 500 µL) a temperatura ambiente y se anota en libreta y registro (Anexo 1) el código de las muestras. Una vez descongeladas completamente se debe comenzar el proceso, la incubación prolongada puede afectar la integridad del ARN.

NOTA: Si las muestras no provienen del biobanco: Se transfiere el plasma a tubos de 1,5 mL estériles y se rotulan (tapa y pared) con el n° de procesamiento de muestra asignado. Se centrifuga a 16.000xg (9800 rpm) a 4°C durante 10 min en centrifuga de ángulo fijo para eliminar restos celulares.

6. Se hacen duplicados de cada muestra transfiriendo 200 µL del plasma a dos tubos de 1,5 mL (Figura 1).
Nota: En caso de no alcanzar volumen para hacer 2 alícuotas de 200 µL se guarda muestra a -80°C y se anota en la columna de incidencias del registro (Anexo1) para la toma de decisiones futuras.
7. Se añade 1000 µL QIAzol Lysis Reagent a cada uno de los tubos con 200 µL plasma (5 veces el volumen de plasma), cuidando de no tocarlos con la punta de la pipeta (Figura 1). Esto permitirá hacer la operación con la misma punta con filtro

Nota: Los tubos se disponen siguiendo el orden numérico para evitar perder muestras por perdida de rótulo

8. Se mezcla con vortex o pipeteando hasta que desaparezca el agregado blanco.
9. Se deja el lisado a temperatura ambiente (15–25°C) durante 5 min.
10. Se añade 200 µL de cloroformo a cada tubo y se tapan los tubos.
11. Los tubos se voltean y se agitan en vortex 15 s hasta homogenizar las fases (aspecto lechoso).
12. Se dejan los tubos a temperatura ambiente (15–25°C) durante 2-3 min.
13. Se centrifuga durante 15 min a 12000xg (8800 rpm) a 4°C.
14. Se ponen los tubos en gradilla con cuidado de no mezclar las tres fases apreciables: fase acuosa superior incolora que contiene ARN (miARNs), interfase blanca y fase orgánica rosa inferior.
15. Se ajusta la centrifuga a 20°C para los sucesivos pasos.
16. Se transfiere 600 µL de la fase acuosa superior a nuevo tubo de 1,5 mL, evitando arrastrar interfase.
17. Se añade 900 µL etanol absoluto a cada tubo a la fase acuosa con cuidado de no tocar para usar la misma punta.
18. Se mezcla por pipeteo cada tubo y se transfieren 700 µL a una columna RNeasy MinElute spin columna (Figura 1). Se deja la punta con filtro en el tubo del que se tomó la muestra para reutilizar en siguientes pasos.
19. Se tapa la columna, y se centrifuga a 8000xg (6800 rpm) durante 15 s a temperatura ambiente (15–25°C). Se coloca recipiente para desechos al lado de centrifuga.
20. Se descarta el eluido en recipiente para desechos. Se reutiliza la columna y su tubo de colección de 2 mL en el siguiente paso.
21. Se pipetea con misma punta colocada en tubo 1 (paso 18) otros 700 µL del contenido del tubo 1 a la columna, se repiten pasos 18 -20

22. Se repiten los pasos del 18 al 20 con el tubo 2 de cada muestra
Nota: Una columna será centrifugada y eluida 4 veces para poder unificar el contenido de los 2 tubos de cada muestra.
23. Se añaden 700 μ L de tampón RWT a cada columna, cuidando de no tocarla con la punta de la pipeta, se tapa y centrifuga durante 15 s a 8000xg (10000 rpm) a temperatura ambiente. Se descarta el eluido, pero se reutiliza la columna y su tubo de colección de 2 mL en el siguiente paso.
24. Se añaden 500 μ L de tampón RPE a cada columna, cuidando de no tocarla con la punta de la pipeta, se tapa y centrifuga durante 15 s a 8000xg (6800 rpm) a temperatura ambiente. Se descarta el eluido, pero se reutiliza la columna y su tubo de colección de 2 mL en el siguiente paso.
25. Se añaden 500 μ L de etanol 80% a cada columna, cuidando de no tocarla con la punta de la pipeta, se tapa y centrifuga durante 2 min a 8000xg (6800 rpm) a temperatura ambiente.
26. Se descarta el tubo colector con el eluido
27. Se coloca la columna sobre un nuevo tubo de 2 mL (proporcionado en el kit). Se destapa la columna y se colocan (si es posible) en la centrífuga con al menos una posición vacía entre las columnas, orientando las tapas en la dirección opuesta a la rotación del rotor (indicado por una flecha en la centrífuga).
28. Se centrifuga a 10000xg (8000 rpm) durante 5 min y se descarta tubo colector con eluido.
29. Se retira recipiente con desechos de colectores y eluidos de la cercanía de la centrífuga para evitar en el próximo paso por rutina descartar el eluido.
30. Se coloca la columna sobre tubo de 1,5 mL (proporcionado en el kit) ya rotulado.
31. Se añade 25 μ L de agua libre de ARNasas directamente en el centro de la membrana de la columna, pero sin tocarla. Se cierra la tapa y centrifuga durante 1 min a 10000xg (8000 rpm).
Nota: El volumen muerto de la columna de rotación RNeasy MinElute es de 2 μ L: la elución con 25 μ l de agua libre de ARNasa da como resultado un eluido de aproximadamente 23 μ L.
32. Se toma el volumen de eluido resultante y se añaden en el centro de la columna (esto aumenta el rendimiento de extracción). Se cierra la tapa y centrifuga durante 1 min a 10000xg (8000 rpm) (volumen final obtenido es de aproximadamente 21 μ L).
33. Se tapa el tubo con el eluido (miARNs) y se verifica esté bien rotulado con el código de muestra de EpiDisease y fecha.
34. Se cuantifica en Nanodrop según PE.0.001 "Cuantificación en Nanodrop". Los rendimientos típicos suelen estar entre 15-50 ng/ μ L, con una media de 30 ng/ μ L.
35. Se guardan los tubos a -80°C hasta su análisis posterior por PCR cuantitativa o para ser analizado con plataformas de alto rendimiento.

Anexo V: PNT de EpiDisease ID.PE.001. CUANTIFICACIÓN DE RNA MEDIANTE NANODROP™ 2000 SPECTROPHOTOMETER (THERMO SCIENTIFIC)

INSTRUCCIÓN DE TRABAJO CUANTIFICACIÓN DE RNA MEDIANTE NANODROPTM 2000 SPECTROPHOTOMETER (THERMO SCIENTIFIC)

PROCEDIMIENTO

1. Haga doble clic en el icono de escritorio software NanoDrop 2000 y seleccione la aplicación de interés.
2. Seleccione el ensayo que vaya a realizar. En nuestro caso: Nucleic Acid.
3. Aparecerá en la pantalla el siguiente mensaje: "Load last workbook ". Pulsar NO.
4. Una vez realizada esta operación aparecerá el siguiente cuadro de diálogo: "Routine verification of measured wavelengths needs to be done. Make sure the arm is down and click ok to start the verification". A continuación, pulsar OK.
5. Establecer un blanco con el tampón adecuado o agua en función de lo que se utilizó para eluir. Tomar 1-2 µl del blanco y depositarlo en la parte inferior del pedestal, baje el brazo y haga clic en el botón que indica Blanc. (Generalmente se usa como blanco el mismo tampón con el que se ha eluido el RNA: Elution Buffer, RNA-free water).

Nota Una alícuota del blanco se mide como si se tratara de una muestra. Esto confirmará que el instrumento está funcionando bien. El resultado debe ser un espectro que varía no más de 0,04 A (10 nm de absorbancia equivalente). De no ser así se limpia y se vuelve a hacer el blanco

6. Limpie el pedestal con papel de laboratorio (no deje peluzas) e introduzca el ID de la muestra de interés en el campo correspondiente. Pipetear 1-2 µl de la muestra y medir (pulse Play). Se recomienda siempre tomar una nueva alícuota de la muestra para cada medición.
7. Después de una medición: Limpie los pedestales de medición con un papel de laboratorio. El instrumento está listo para la siguiente muestra.
NOTA: 100 ng de ARN total (20 uL a 25 ng/uL) son suficientes para llevar a cabo estudios con plataformas de alto rendimiento, plataformas de secuenciación tipo Ion Torrent o Illumina y también para qPCR.
8. Valores $A_{260}/_{280} > 1.7$ se corresponden a una muestra de ARN con una pureza aceptable. Un ratio $A_{260}/_{280} < 1.7$ sería indicativo de contaminación por la presencia de compuestos aromáticos.

Anexo VI: PNT de EpiDisease PNT: ID.T.002 CUANTIFICACIÓN miARNs POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON RETROTRANSCRIPCIÓN

INSTRUCCIÓN DE TRABAJO CUANTIFICACIÓN miARNs POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON RETROTRANSCRIPCIÓN

- Se estima qué volumen de reacción de RT (Vrt) permitirá obtener suficiente cDNA para posterior cuantificación de los miRNAs de interés por qPCR, considerando que:
 - En la qPCR se utiliza 1 µL de cDNA por reacción (pocillo).
 - Las muestras se analizan por replicado (R), 2 o 3 en la qPCR).
 - El error de pipeteo reduce el rendimiento de la RT en un 10-20%. Por ejemplo, en una RT de 20 microL se puede perder por error de pipeteo 2 µL rindiendo 18 µL equivalente a 18 reacciones de qPCR por muestra.

Por tanto,

$$\text{Vrt} = (1\mu\text{L} \times R \times A) + \% \text{ error} \quad (\times 1,12 \text{ HASTA } 1,20)$$

Nota 1: Se adiciona el 2 en el cálculo para compensar la pérdida del volumen por error en el pipeteo (aproximadamente un 10%)

R: número de replicados.

A: número de miARNs a ensayar.

Ejemplo: 2 miARNs, 2 réplicas, y 4 muestras

$$\text{Vrt} = (1 \times 2 \times 2) \times 1,12 \text{ HASTA } 1,20$$

$$\text{Vrt} = 4,48$$

Por tanto, se hace una RT de 10 µL

La RT de 10 µL rinde cDNA suficiente para estudiar 4 miARNs por muestra cuando se hacen 2 réplicas (8:2) o 2 miARNs cuando se hacen tres réplicas (8:3). Si se analizan más miRNAs por muestra se hacen RT de 15 o 20 µL, incluso se puede hacer más de una RT por muestra.

- Con los datos de concentración de RNA de las muestras se calcula qué volumen se debe añadir a la reacción RT para incluir una cantidad de RNA constante en la reacción (50 ng, ó 100 ng ó 200 ng)

Nota 2: Si las muestras están muy concentradas y el volumen a pipetear está por debajo del límite de precisión de las pipetas disponibles se deberá diluir la muestra con agua libre de RNAsa

- Se calcula el volumen de cada componente de la mezcla (mix) de reacción multiplicando el volumen (Tabla 1) por número final de pocillos (NF), NF incluye el número de muestras (N), Réplicas de RT (R-RT) el C-RT y porcentaje del error de pipeteo.

$$\text{NF} = (N \times R) + \text{C-RT} + 10\% \text{ de error pipeteo} \quad (\times 1,12 - \text{HASTA } 1,20)$$

$$\text{Ejemplo NF} = (4 \times 1) + \text{C-RT} + 1 = 6$$

Tabla 1: Componentes de la mix para RT por pocillo.

Componentes MIX	conc	Vol (uL)			Vol x NF
		10	15	20	
dNTPs 100 mM	2mM	0,2	0,3	0,4	
Reverse Transcriptasa Multiscribe, 50 U/uL	100	2	3	4	
buffer RT 10x	1x	1	1,5	2	
inhibidor RNAsa 20 U/uL	0,25	0,125	0,19	0,25	
Primer o pool de Primers (5x)***	0,2x	0,4 cada primer	0,6 cada primer	0,8 cada primer	
Muestra de RNA		V*	V*	V*	
Agua libre de nucleasas		V**	V**	V**	

V* = depende de la concentración de RNA de la muestra y de la cantidad de RNA elegida para el ensayo (50, 100 o 200 ng), siendo 50 y 100ng las más usadas

V** = cantidad suficiente para completar el volumen final de MIX

Nota 3: La primera vez que se diseña el experimento se debe hacer la RT con dos (O MÁS)

mix. Uno con el pool de primers completo y otro (U OTROS) con un solo primer, para verificar si hay variación en el CT por efecto de los demás miARNs del pool (Ver ejemplo Figura 3).

Nota 4: El pool de primer está optimizado para que la concentración de cada primer en la reacción de PCR sea de 0.2X, (en lugar de 1x que es la recomendada por el kit).

Nota 5: Los productos de cDNA obtenidos de cada RT de cada muestra se usan en el siguiente paso para analizar en esa muestra todos los miARNs.

4. Se verifica disponibilidad de material acorde al número de muestras a procesar.
5. Se confecciona plantilla de placa de 96 pocillos para reacción RT, en el caso de pocas muestras se puede hacer en tubos de PCR, el diseño se plasma en libreta de trabajo u hoja excel. Se recomienda en caso de placa de 96 pocillos poner muestras en columna en orden consecutivo (Figura 3, primera columna) para facilitar la toma de cDNA con la pipeta multicanal para la posterior qPCR.

		POOL	miR1	miR2	miR1	miR2				
⁹⁶ POCILLOS		1	2	3	4	5	9	10	11	12
A		1	1							
B		2		2						
C		3			3					
D		4				4				
E		C-RT								
F										
G										
H										
I										
J										
K										

Figura 3: Ejemplo de placa de RT de 96 pocillos con 4 muestras y 2 miARNs. En la primera columna las muestras con el pool de primers y en las otras las muestras con un solo primer

PROCEDIMIENTO

Reacción RT

9. Se limpia zona de trabajo con alcohol al 70% o con agente RNaseZAP™ cleaning agent para eliminar ARNasa.
10. Se pasa un papel seco.
11. Se colocan en hielo todos los componentes para que se descongelen, menos transcriptasa.
12. Se agitan suavemente los componentes una vez descongelados y se centrifugan a SE LE DA UN SPIN bajas revoluciones para que todo el líquido vaya al fondo.
13. Se adicionan, en un tubo de polipropileno de volumen apropiado y rotulado como MIX, los componentes de la mix por el orden de la **Tabla 1**, menos RNA y agua, se señala en la libreta de trabajo cada componente una vez añadido.
14. Se agita la mix y se añade en cada tubo o pocillo el volumen correspondiente
15. Se adiciona el volumen de RNA y agua de cada muestra, se tapan los tubos o se sella la placa con la lámina plástica con ayuda de espátula, especialmente en los bordes.
16. Se centrifuga la placa o los tubos con la mezcla de reacción RT. SE LE DA UN SPIN EN UNA CENTRÍFUGA (SPIN) APROPIADA PARA PLACAS
17. Se colocan en termociclador, y se selecciona el programa (según proveedor del kit) (Tabla 2)
18. Se selecciona volumen de reacción a 10 15 o 20 uL.

19. Se pone en marcha la reacción

Tabla 2: Programa de RT.

Fase	Tiempo	Temperatura
1	30 min	16°C
2	30 min	42°C
3	5 min	85°C
4	∞	4°C

20. El producto de la RT se guarda a -20°C hasta su uso

PCR cuantitativa

Operaciones preliminares

1. Se prepara mix para cada miRNA, para ello se calcula el volumen de cada componente de la mix de qPCR (Tabla 3) por número final de pocillos (NF).

$$NF = (N \times R) + C\text{-RT} + C\text{-qPCR} + 15\% \text{ de error pipeteo}$$

$$\text{Ejemplo NF} = (4 \times 2) + C\text{-RT} + C\text{-qPCR} + 1 = 11$$

N: número de muestras a ensayar.

R: número de replicados (2 normalmente)

C-RT,

C-qPCR

Nota 4: el % de error de pipeteo es de 15% para cuando el análisis es por duplicado, y 20% más para cuando es por triplicado.

Tabla 3 Componentes de la mix para qPCR.

Componente	Reacción 10 uL (V uL)
TaqMan Small RNA assays (20x) ^{&}	0,5
TaqMan Universal Master MIX II (2x)	5
Agua libre de nucleasas	3,5

& Específico para cada miRNA

- Se verifica disponibilidad de material acorde al número de muestras a procesar.
- Se confecciona plantilla de placa de 384 pocillos para reacción de qPCR (ejemplo Figura 4).

384 POCIL LOS	1	2	3	4	...	20	21	22	23	24
A	1	1	1	1						
B	1	1	1	1						
C	2	2	2	2						
D	2	2	2	2						
E	3	3	3	3						
F	3	3	3	3						
G	4	4	4	4						
H	4	4	4	4						
I	5	5	5	5						
J	5	5	5	5						
K	6	6	6	6						
L	6	6	6	6						
M	C-RT	C-RT	C-RT	C-RT						
...	C-qPCR	C-qPCR	C-qPCR	C-qPCR						
O										
P										

Figura 4: Ejemplo de placa de qPCR de 384 pocillos con 6 muestras, 4 miARNs y 2 réplicas.

1. Se limpia zona de trabajo con alcohol al 70% o con agente RNaseZAP™ cleaning agent para eliminar ARNasa.
2. Se pasa un papel seco.
3. Se colocan en hielo todos los componentes (TaqMan Universal Master Mix II, no UNG. TaqMan small RNA assays).
4. Se agitan suavemente los componentes y se centrifugan a bajas revoluciones para que todo el líquido vaya al fondo
5. Se adicionan, en un tubo de polipropileno de volumen apropiado, los componentes de la mix por el orden de la Tabla 3 y se señala en libreta una vez añadido.
6. Se agita y se adiciona en cada pocillo 9 microL de mix
7. Se adiciona 1 µL de cDNA, obtenido en la reacción RT, al pocillo correspondiente, incluyendo el C-RT (1 µL de producto de Control RT) y 1 µL de agua (C-qPCR)
8. Se tapa placa con plástico y se adhiere bien con espátula, especialmente los bordes.
9. Se centrifugan la placa por 1 min a máxima velocidad.
10. Se coloca en termociclador Quant Studio 5000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, EEUU), y se selecciona el programa (Tabla 4).

Tabla 4: Programa de qPCR.

Activación Enzima	PCR	
	45 ciclos	
	Desnaturalización	Cebado/extensión
95°C	95°C	60°C
10 min	15 s	60s

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MENORES

Título del estudio: “ESTUDIO OBSERVACIONAL AMBISPECTIVO PARA LA VALIDACIÓN CLÍNICA A PEQUEÑA ESCALA DE LA FUNCIÓN PRONÓSTICO DEL TEST ScolioPro® A PARTIR DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE ESCOLIOSIS IDIOPÁTICA ADOLESCENTE (EIA), CON RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS DESDE EL MOMENTO DE DIAGNÓSTICO”.

Código del estudio: E.01

Promotor: EpiDisease S. L.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: _____

CENTRO: _____

Introducción

Nos dirigimos a ti para informarte e invitarte a participar en un estudio de investigación sobre la enfermedad que te han dicho que padeces: Escoliosis Idiopática Adolescente. Se te entregará esta hoja de información en la que se explican los puntos más importantes del estudio para ayudarte a decidir si deseas participar en el estudio y, si deseas participar, deberás firmar este documento. Tu padre/ madre/ representante legal también deberán firmar una hoja similar para que puedas participar, y serán informados al igual que tú, sobre el desarrollo de esta investigación.

El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación con medicamentos (CEIm) del Hospital Universitari Dr. Peset (es un grupo de personas que revisan que el estudio sea seguro y que garantizan que se cumplan tus derechos) de acuerdo a las leyes actuales y a normas relacionada con la investigación en personas o en su material biológico (como en este caso que será tu sangre).

Nuestra intención es que tengas la información correcta y suficiente para que puedas decidir si quieres participar o no en el estudio. Por favor pregúntale al médico del estudio o a sus colaboradores cualquier pregunta o cuestión que no entiendas, y no firmes el consentimiento informado a menos que estés satisfecho con las respuestas a tus preguntas y quieras participar en este estudio. Además, puedes consultar con las personas que necesites, y tu decisión sobre participar o no, no la tienes que tomar ahora mismo.

¿Estoy obligado a participar?

Tu participación en este estudio es totalmente voluntaria y puedes decidir no participar. Si tus condiciones lo permiten y en todo caso, si tienes entre 12 y menos de 18 años puedes decidir no participar en el estudio, aunque tus padres hayan decidido que sí. Si decides que quieres participar, puedes retirar el consentimiento en cualquier momento sin tener que dar ninguna explicación o justificación sobre tus motivos, sin que ello afecte a la relación con tu médico ni a tu tratamiento. Si quieres dejar el estudio en algún momento, por favor, díselo al médico responsable del estudio en tu hospital.

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Este estudio incluirá 50 pacientes, entre los 10 años y menores de 18 años de edad, que acuden a dos hospitales de València por padecer Escoliosis Idiopática Adolescente. A los pacientes se les analizará durante el estudio un total de tres muestras sanguíneas. Este estudio tiene una duración de 18 meses y, además de los datos obtenidos de las muestras de sangre, también se van a recoger los datos de tu Historia Clínica relacionados con la Escoliosis Idiopática Adolescente (es decir, toda la información que el médico ha obtenido de tu enfermedad y ha guardado) desde que se te diagnosticó la enfermedad hasta que termine el estudio.

En las muestras de sangre se medirán unos determinados biomarcadores (son unas sustancias de nuestro organismo que se miden y permiten conocer, por ejemplo, nuestro estado de salud o el riesgo a padecer una enfermedad) con un test llamado ScolioPro®. Se compararán los resultados obtenidos del análisis de estos biomarcadores en la sangre con los datos de tu historia clínica para poder saber si hay relación entre ambos. Con esto se quiere estudiar si el test ScolioPro® permite saber si la curvatura de tu columna va a

aumentar o no, a lo largo del tiempo. Si en un futuro se demuestra que el test sirve para esto, se evitarían las repetidas radiografías que se te realizan normalmente para el seguimiento de tu enfermedad.

Si se confirma el buen funcionamiento del test Scolipro® este estará disponible para que los médicos lo puedan utilizar en otros niños que padezcan tu enfermedad.

Objetivo del estudio

El objetivo de este estudio es saber si las sustancias que hay en tu sangre medidas con el test Scolipro® sirven para saber si tu columna aumentará su curvatura a lo largo del tiempo.

Procedimientos del estudio

Serás incluido en el estudio si cumples con las condiciones que se han considerado necesarias para participar (a esto se le denomina los criterios de inclusión), y tras la firma de este documento, así como el que también debe firmar tu padre/ madre/ representante legal.

Tu participación en el estudio implicará que se te tomarán muestras de sangre para la investigación. Para garantizar que se respetan tus derechos, se tendrán en cuenta las leyes. Al firmar este documento aceptas que se utilicen tus muestras para los objetivos de este estudio.

Tus muestras para este estudio se guardarán en el Biobanco CIBERER que está en València y que es un lugar que recoge, almacena y distribuye material biológico (sangre, tejido, etc.) y los datos que se obtienen de este material.

Además, puedes decidir si quieres que las muestras de sangre que sobren después de este estudio sean guardadas en el Biobanco del CIBERER para otros estudios. Si quieres que esto sea así, deberás dar tu aprobación firmando el Consentimiento Informado del Biobanco. En caso de no firmar este documento las muestras serán destruidas.

La muestra de sangre se te sacará y será preparada en el hospital para separar la parte de la sangre que se va a utilizar para el estudio (esta parte de la sangre se llama plasma sanguíneo). Las muestras que se recojan se guardarán en el Biobanco para que se mantengan en buenas condiciones. Después, los investigadores de este estudio pedirán las muestras al Biobanco para poder analizarlas con el test Scolipro®, en los laboratorios de investigación.

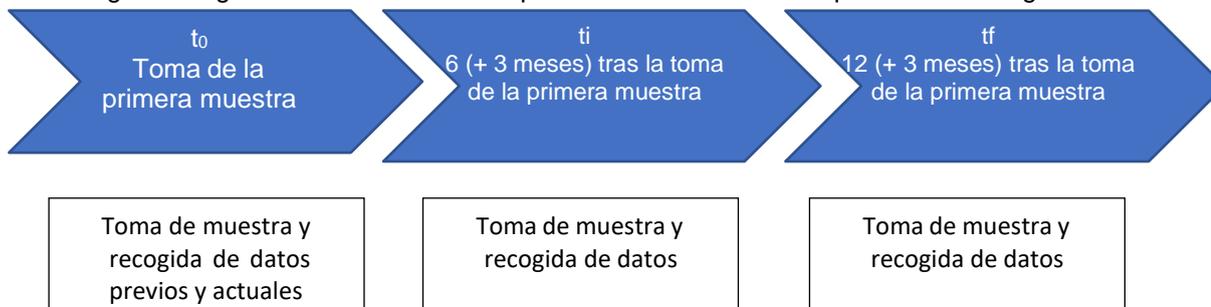
Para el estudio se te analizarán tres muestras:

- 1ª Muestra (es posible que ya esté disponible en el biobanco CIBERER).
- A los 6 meses desde la primera muestra.
- A los 12 meses desde la primera muestra.

También durante el estudio se recogerán los datos que están en tu historia clínica relacionados con la enfermedad, desde el momento en el que descubrieron que la tenías y durante aproximadamente los 18 meses después de que entres en el estudio.

Si decides participar en el estudio, no están programadas visitas adicionales a las que normalmente haces al médico por tu enfermedad.

En la siguiente figura te mostramos un esquema con la información que se va a recoger durante el estudio:



Incomodidades y riesgos derivados del estudio

Las actividades previstas en este estudio no tienen riesgo para tu salud ni ponen en peligro el correcto diagnóstico y tratamiento de tu enfermedad.

Si tienes alguna duda puedes preguntarle al médico o enfermeros que te atienden.

Para la mayoría de las personas, los pinchazos con agujas para sacar sangre casi no tienen efectos secundarios y no suelen suponer ningún problema. Lo más frecuente que podría pasarte es que te puedas sentir mareado, o te aparezcan pequeñas moraduras (hematomas) en la zona del pinchazo que desaparecen en 1 ó 2 días. Con menos frecuencia puede haber sangrado (hemorragias), molestias, infecciones y/o dolor en el punto en el que se te ha sacado sangre.

Es posible que sea necesario algún dato o muestras adicionales. En ese caso, el médico del estudio se pondrá en contacto con tu padre/ madre/ representante legal para solicitar de nuevo tu colaboración. Se te informará de los motivos y se solicitará de nuevo tu consentimiento.

Además, en el procedimiento hay un registro de datos, que no supondrá ningún riesgo para ti. La información recogida se mantendrá de forma confidencial como se explica más adelante.

Beneficios esperados

Es posible que tu participación en este estudio no tenga ningún beneficio directo para tu salud.

No recibirás dinero por la donación de las muestras ni por la recogida de los datos proporcionados.

Es posible que con tu participación en este estudio puedas ayudar en el futuro a otros niños con tu enfermedad.

Advertencia relativa al embarazo y lactancia

El estudio no permite la participación de embarazadas o madres lactantes. Si eres una chica y te quedaras embarazada durante tu participación, por favor informa al médico del estudio.

Gastos del estudio

Quien dirige este estudio (llamado promotor) se encargará de todos los pagos que sean necesarios para la realización de este estudio (incluida la compensación al investigador y al hospital).

Tu participación no supondrá ningún gasto adicional al que hubieras tenido si no participaras en el mismo.

Confidencialidad y protección de datos personales

Quien dirige este estudio se compromete a cumplir las leyes para la protección de tus datos tanto Españolas como Europeas.

Las muestras recogidas para el estudio y los datos de tu historia clínica estarán identificadas mediante códigos, de manera que en ningún caso se incluya información que pudiera identificarte (como nombre y apellidos, iniciales, dirección, etc.) y sólo el médico del estudio/colaboradores y personal autorizado podrán saber tus datos personales. Por lo tanto, tu identidad no la conocerá ninguna persona a no ser que se necesite en caso de urgencia médica o porque lo exija la ley.

Los datos se guardarán en el hospital y sólo se utilizarán para tu participación en este estudio.

De acuerdo a lo que establece la ley de protección de datos, tu padre/madre o representante legal puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberán dirigirse a tu médico del estudio. Además de estos derechos, también puedes limitar el tratamiento de datos que no sean correctos, solicitar una copia o que se trasladen a un tercero. Para ello tu padre/ madre/ tutor legal deberá contactar con el investigador principal del estudio o con la persona encargada en el centro (Delegado de Protección de Datos del centro) (si aplica) en: _____ (Incluir Dirección/contacto en los centros que dispongan de esta figura).

Si decides dejar el estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos ni se te tomarán más muestras para este estudio, pero sí se utilizarán los datos que ya se hayan recogido hasta ese momento ya que no se pueden eliminar aunque dejes de participar en el estudio para cumplir con la ley y asegurar que la investigación sea válida. Tu padre/madre o representante legal puede dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si lo necesita.

En el caso de que se mandasen tus datos identificados mediante códigos se facilitarán fuera de la Unión Europea, a centros o empresas que proporcionen un servicio, o colaboradores del promotor tus datos quedarán protegidos. Si necesitas saber más al respecto, tu padre/madre o representante legal puede contactar al/ la Delegado/ a de Protección de Datos del promotor (<http://www.epidisease.com/es/contacto/>).

Otra información relevante

El médico te mantendrá al tanto de cualquier nueva información que se genere durante el estudio y que pueda afectar en tu decisión para que continúes participando en el estudio.

También debes saber que puedes ser retirado del estudio si el promotor o los investigadores del estudio lo consideran oportuno. En cualquiera de los casos, recibirás una explicación adecuada del motivo. Al firmar la hoja de consentimiento te comprometes a cumplir con los procedimientos del estudio que se te han explicado.

Debes saber que es posible que tu médico del Centro de Salud sepa que estás participando en este estudio.

En el caso de que en este estudio se obtengan datos que pudieran ser importantes para tu salud o a la de tu familia, tu padre/ madre/ representante legal podrán pedir que se los comuniquen. Cuando alcances la mayoría de edad tendrás el mismo derecho y también podrás acceder a la información relativa a la utilización de tu muestra de sangre.

Contacto en caso de dudas

Si durante la participación tienes alguna duda o necesitas obtener más información, tu padre/ madre/ representante legal puede ponerse en contacto con _____ (Nombre y servicio Médico del estudio), en el teléfono _____ (teléfono de contacto).

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO*

Título del estudio: “ESTUDIO OBSERVACIONAL AMBISPECTIVO PARA LA VALIDACIÓN CLÍNICA A PEQUEÑA ESCALA DE LA FUNCIÓN PRONÓSTICO DEL TEST ScolliPro® A PARTIR DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE ESCOLIOSIS IDIOPÁTICA ADOLESCENTE (EIA), CON RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS DESDE EL MOMENTO DE DIAGNÓSTICO”.

Código del estudio: E.01

Promotor: EpiDisease S. L.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: _____

CENTRO: _____

**Este consentimiento será firmado por aquellos pacientes que durante su participación en el estudio alcancen su mayoría de edad (18 años) y, por tanto, sea necesario obtener su consentimiento.*

Introducción

Nos dirigimos a usted para informarle acerca del estudio de investigación sobre Escoliosis Idiopática Adolescente, en el que fue incluido por haber sido diagnosticado de la enfermedad. Por ser menor de edad cuando se inició el estudio su inclusión la autorizó su padre/madre/ representante legal quien firmó el Consentimiento informado en su nombre. Al haber alcanzado la mayoría de edad, le proporcionamos toda la información para que pueda consentir si decide seguir participando en el mismo. En esta hoja de información se le explican los aspectos esenciales del estudio para ayudarle a decidir.

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación con medicamentos (CEIm) del Hospital Universitario Dr. Peset, de acuerdo a la legislación vigente (Ley 14/2007, de 3 de julio de Investigación Biomédica) sobre proyectos de investigación sobre seres humanos o su material biológico, y se lleva a cabo con respeto a los principios enunciados en la declaración del Helsinki para investigaciones médicas en seres humanos.

Por favor, lea esta hoja informativa con atención y plantee al médico participante en el estudio o a sus colaboradores cualquier pregunta o cuestión que no entienda. No firme el consentimiento informado a menos que esté satisfecho con las respuestas y desee continuar participando en este estudio. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

Voluntariedad

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y puede decidir no participar, cambiar su decisión o retirar el consentimiento en cualquier momento sin necesidad de dar ninguna explicación o justificación sobre su motivo y sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su atención sanitaria.

Si usted deseara abandonar su participación en el estudio en algún momento, por favor, notifíquese al médico responsable del estudio en su centro

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Este estudio incluye 50 pacientes adolescentes entre los 10 años y menores de 18 años de dos hospitales de València diagnosticados de Escoliosis Idiopática Adolescente. A estos pacientes se les toma un total de tres muestras sanguíneas durante el estudio. Además, durante el transcurso del estudio (duración total de 18 meses) se extraen de la Historia clínica los datos clínicos que caracterizan la Escoliosis Idiopática Adolescente, que han sido registrados desde el diagnóstico y así se proseguirá hasta el cierre del estudio.

En las muestras sanguíneas se analizan determinados biomarcadores (son sustancias utilizadas como indicadores de un estado biológico) usando para ello un test de diagnóstico *in vitro* denominado “ScolliPro®”. La correlación de los biomarcadores con los datos clínicos se estudiará con el fin de determinar la capacidad del test ScolliPro® de predecir el riesgo de evolución de la escoliosis. Si el test fuera válido para pronosticar la evolución de la enfermedad, en el futuro se evitarían las repetidas exposiciones a los rayos X a las que debe someterse un paciente en la práctica clínica actual para la monitorización y seguimiento de la escoliosis.

El test ScolioPro® todavía no se encuentra comercializado. Si tras este estudio se valida su función pronóstica, el promotor procederá a solicitar las autorizaciones necesarias para que este test pueda ser comercializado.

Objetivo del estudio

El objetivo de este estudio es identificar si existe correlación entre los biomarcadores medidos en las muestras sanguíneas, con ayuda del test ScolioPro®, y las variables clínicas que se están incluidas en la historia clínica para describir el curso de la Escoliosis Idiopática Adolescente, desde su diagnóstico hasta el momento de cierre del estudio (18 meses), y así comprobar si el test ScolioPro® es válido para predecir la evolución clínica de la escoliosis.

Procedimientos del estudio

Usted fue incluido en el estudio, tras la firma del consentimiento informado firmado por su padre/ madre/ representante legal, porque cumplía los criterios de inclusión. Ahora que ha alcanzado la mayoría de edad, se solicita que firme este consentimiento informado en el caso de querer seguir participando en el mismo.

Su participación en este estudio conlleva la obtención y utilización de muestras biológicas con fines de investigación, para lo que se observará además de la Ley 14/2007 de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, normativas que garantizan el respeto a sus derechos. Al firmar este documento, usted acepta que se utilicen sus muestras para las finalidades del presente estudio.

Las muestras se depositan en la colección de muestras específica para este estudio en el Biobanco del Centro de Investigación Biomédica en Red- Enfermedades Raras (CIBERER) (Instituto de Salud Carlos III), ubicado en el Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP) de València.

Además, usted puede manifestar su voluntad de ceder las muestras sobrantes de este estudio para futuras investigaciones al Biobanco del CIBERER mediante la firma del Consentimiento Informado del Biobanco, de lo contrario, las muestras serán destruidas.

Las muestras sanguíneas obtenidas por venopunción en el Centro Hospitalario son procesadas para separar el plasma sanguíneo y se depositan para su custodia en una colección de muestras para el estudio en el Biobanco CIBERER para asegurar la calidad, la trazabilidad y el mantenimiento en óptimas condiciones de las muestras recogidas. Posteriormente, los investigadores solicitan las muestras al Biobanco CIBERER para poder analizarlas con el kit ScolioPro® en los laboratorios de investigación.

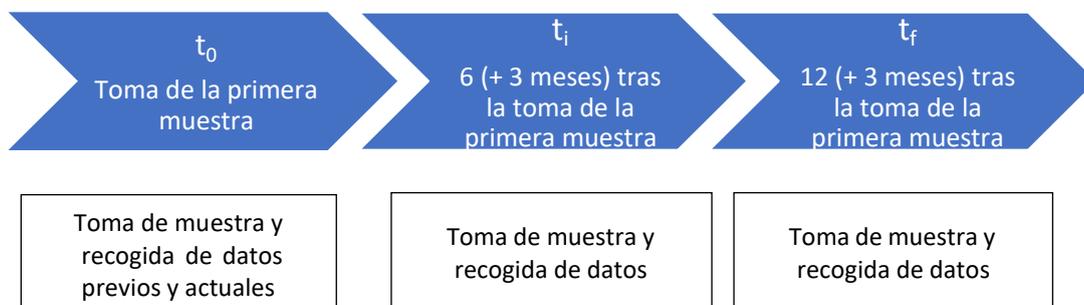
Para el estudio se toman muestras (8 ml de sangre) en tres momentos temporales:

- 1ª muestra (es posible que ya esté disponible en el biobanco CIBERER).
- A los 6 meses desde la primera muestra.
- A los 12 meses desde la primera muestra.

En el seguimiento que se le realiza durante este estudio también se recogen los datos referentes a la enfermedad en estudio, que han sido plasmados en su historia clínica desde el diagnóstico y hasta el momento de cierre de estudio, aproximadamente 18 meses después de su inclusión en el estudio.

La participación en el estudio no supone que tengas que realizar más visitas que las que normalmente realizarías para el seguimiento de tu enfermedad.

En la siguiente tabla le mostramos un esquema de la información que se recoge durante el estudio.



Incomodidades y riesgos derivados del estudio

El procedimiento propuesto no supone ningún riesgo añadido para su salud ni compromete el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad.

La extracción de sangre apenas tiene efectos secundarios; para la mayoría de las personas, las punciones con agujas para la extracción de sangre no suponen ningún problema. Lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 ó 2 días, ocasionalmente puede sentirse mareado o producirse hemorragias, molestias, infecciones y/o dolor en el punto de extracción de sangre.

En el caso que sea necesario algún dato o muestras adicionales el médico del estudio se pondrá en contacto con usted para solicitar de nuevo su colaboración. Se le informará de los motivos y se le solicitará de nuevo su consentimiento.

Además, en el procedimiento hay un registro de datos, que no supondrá ningún riesgo para usted. La información recogida se mantendrá de forma confidencial como se explica más adelante.

Beneficios esperados

Es posible que su participación en este estudio no implique ningún beneficio médico directo para usted.

No percibirá ningún beneficio económico por la donación de las muestras y la cesión de los datos proporcionados, ni tendrán derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación efectuada.

Es posible que al contribuir al desarrollo y validación del test Scolipro® pueda ayudar en el futuro al pronóstico de la enfermedad y con ello a un tratamiento precoz y personalizado según el riesgo de progresión de la escoliosis.

Advertencia relativa al embarazo y lactancia

El estudio no permite la participación de embarazadas o madres lactantes. Si es mujer y se quedara embarazada durante el transcurso de su participación, por favor informe al médico del estudio.

Gastos y compensación económica

El promotor del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo. Para la realización del estudio el promotor ha firmado un contrato con el centro donde se va a realizar y con el médico del estudio. Tanto el centro como el investigador recibirán una compensación económica por la realización del estudio.

Su participación en este estudio no supondrá para usted ningún gasto adicional a la práctica clínica habitual.

Confidencialidad y protección de datos personales

El promotor se compromete al cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal y al Real Decreto que la desarrolla (RD 1720/2007). Así como el Reglamento Europeo 2016/679 de 27 de abril de 2016 de Protección de datos (RGPD). Por ello es importante que conozca la siguiente información.

El promotor ha adoptado las medidas pertinentes para garantizar la protección de su privacidad y no permitirá que sus datos se crucen con otras bases de datos que pudieran permitir su identificación. Tanto el centro como el promotor son responsables respectivamente del tratamiento de sus datos y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos en vigor. Las muestras recogidas para el estudio están identificadas mediante códigos del promotor y del Biobanco y los datos clínicos se recogen de forma codificada, de manera que no se incluya información que pueda identificarle, y sólo el médico del estudio/colaboradores podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a ninguna otra persona salvo a las autoridades sanitarias, cuando así lo requieran o en caso de urgencia médica. Los Comités de Ética de la Investigación, los representantes de la Autoridad Sanitaria en materia de inspección (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios) y el personal autorizado por el Promotor (monitores del estudio, auditores), únicamente podrán acceder para comprobar los datos personales, los procedimientos del estudio clínico y el cumplimiento de las normas de buena práctica clínica (siempre manteniendo la confidencialidad de la información). El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los participantes se ajustarán a lo dispuesto en esta ley.

Los datos se recogen en un fichero de investigación, responsabilidad de la institución, y se tratarán en el marco de su participación en este estudio.

De acuerdo a lo que establece la legislación de protección de datos, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio. Además de estos derechos, también puede limitar el tratamiento de datos que sean incorrectos, solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad) los datos que usted ha facilitado para el estudio. Para ejercitar sus derechos, diríjase al investigador principal del estudio o al Delegado de Protección de Datos del centro (si aplica) en: _____ (Incluir Dirección/contacto en los centros que dispongan de esta figura).

Si usted decide retirar el consentimiento para la participación en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos ni ninguna muestra adicional será tomada, pero sí se utilizarán los datos que ya se hayan recogido hasta ese momento para los fines solicitados. Le recordamos que los datos no se pueden eliminar aunque deje de participar en el estudio para garantizar la validez de la investigación y cumplir con los deberes legales. Así mismo, tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no quedara satisfecho.

Si se realizáramos transferencia de sus datos codificados fuera de la UE a las entidades de nuestro grupo, a prestadores de servicios o a investigadores científicos que colaboren con nosotros, los datos del paciente quedarán protegidos con salvaguardas tales como contratos y otros mecanismos por las autoridades de protección de datos. Si el participante quiere saber más al respecto, puede contactar al/ la Delegado/ a de Protección de Datos del promotor (<http://www.epidisease.com/es/contacto/>).

Otra información relevante

Cualquier nueva información que se genere durante el estudio y que pueda afectar a su disposición para la continuidad de su participación en el estudio le será comunicada por su médico lo antes posible.

También debe saber que usted puede ser excluido del estudio si el promotor o los investigadores del estudio lo consideran oportuno. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo que ha ocasionado su retirada del estudio.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, usted se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

Debe saber que es posible que su médico de Atención Primaria tenga conocimiento de su participación en este estudio.

En el caso de que en este estudio se obtengan datos que pudieran ser clínica o genéticamente relevantes para usted, e interesar a su salud o a la de su familia, podrá solicitar que le sean comunicados por su médico del estudio si así lo indica en la casilla que aparece al final de este documento. No obstante, si hubiera indicado su negativa y cuando esta información, según criterio del médico responsable, sea necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar próximo o a un representante, previa consulta al Comité de Ética Asistencial del centro. La comunicación de esta información se llevará a cabo por profesionales que le podrán explicar adecuadamente su relevancia y las opciones que se pudieran plantear. En caso de información genética clínicamente relevante podrá recibir el preceptivo consejo genético.

Contacto en caso de dudas

Si durante su participación tiene alguna duda o necesita obtener más información, póngase en contacto con _____ (Nombre y servicio Médico del estudio), en el teléfono _____ (teléfono de contacto). A través de este contacto usted podrá ejercitar sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, solicitando el formulario correspondiente. En dicho escrito, deberá adjuntar copia de su DNI para que el Centro responsable de sus datos pueda comprobar su identidad.

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE POR ESCRITO*

Título del estudio: "ESTUDIO OBSERVACIONAL AMBISPECTIVO PARA LA VALIDACIÓN CLÍNICA A PEQUEÑA ESCALA DE LA FUNCIÓN PRONÓSTOCO DEL TEST ScolioPro® A PARTIR DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE ESCOLIOSIS IDIOPÁTICA ADOLESCENTE (EIA), CON RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS DESDE EL MOMENTO DE DIAGNÓSTICO".

Código del estudio: E.01

Promotor: EpiDisease S. L.

**Este consentimiento será firmado por aquellos pacientes que durante su participación en el estudio alcancen su mayoría de edad (18 años) y, por tanto, sea necesario obtener su consentimiento.*

Se me ha explicado el objetivo de este estudio, los procedimientos que se van a seguir y los riesgos y beneficios que conlleva.

He leído la hoja de información que se me ha entregado, permito participar en este estudio y entiendo que puedo retirarme en cualquier momento.

He podido formular preguntas sobre el estudio y he recibido respuesta y suficiente información sobre el estudio y doy mi consentimiento para continuar participando en el mismo.

He hablado con _____

(nombre y apellidos del investigador/persona que obtiene el Consentimiento)

Se me ha comunicado que se me proporcionará una copia firmada y fechada de este consentimiento

Con la firma de este consentimiento, decido voluntariamente participar en este estudio.

Deseo que me comuniquen la información derivada de la investigación que pueda ser relevante para mi salud:

SÍ

NO

Consiento el almacenamiento y uso de mis muestras biológicas sobrantes y de los datos asociados para futuras investigaciones.

SÍ (En este caso se le proporcionará una hoja de información al paciente y consentimiento informado adicional del Biobanco CIBERER)

NO

Consiento a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales.

SÍ

NO

<p>FIRMA del Participante</p> <p>FECHA: _____ <i>(Nombre, firma y fecha de puño y letra por el paciente)</i></p>	<p>FIRMA del Investigador (Persona que obtiene el Consentimiento) FECHA: _____</p> <p>_____ <i>(Nombre completo, firma y fecha de puño y letra por el investigador)</i></p>
<p>Cuando se obtenga el CI en personas con capacidad modificada para dar su CI Firma del representante legal, familiar o persona vinculada de hecho</p> <p>FECHA: _____ <i>(Nombre, firma y fecha de puño y letra por el representante legal)</i></p>	<p>FIRMA del Investigador (Persona que obtiene el Consentimiento)</p> <p>FECHA: _____</p>

CONSENTIMIENTO INFORMADO ORAL ANTE TESTIGOS*

Título del estudio: “ESTUDIO OBSERVACIONAL AMBISPECTIVO PARA LA VALIDACIÓN CLÍNICA A PEQUEÑA ESCALA DE LA FUNCIÓN PRONÓSTOCO DEL TEST ScolioPro® A PARTIR DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE ESCOLIOSIS IDIOPÁTICA ADOLESCENTE (EIA), CON RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS DESDE EL MOMENTO DE DIAGNÓSTICO”.

Código del estudio: E.01

Promotor: EpiDisease S. L.

**Este consentimiento será firmado por aquellos pacientes que durante su participación en el estudio alcancen su mayoría de edad (18 años) y, por tanto, sea necesario obtener su consentimiento.*

Yo, _____ **NOMBRE COMPLETO DEL TESTIGO (nombre y apellidos)** como testigo, afirmo que en mi presencia se ha informado a _____ **NOMBRE COMPLETO DEL PACIENTE** _____ **(nombre y apellidos)**; y se ha leído la hoja de información que se le ha entregado sobre el estudio, de modo que:

- Ha recibido la hoja de información al paciente y consentimiento Informado sobre el estudio firmada y fechada, entendiendo que puede retirarse en cualquier momento.
- Ha podido hacer preguntas sobre el estudio.
- Ha recibido suficiente información sobre el estudio.
- Ha sido informado por _____ **(nombre y apellidos del investigador/persona que obtiene el Consentimiento)**
- Comprende que su participación es voluntaria.
- Comprende que puede retirarse del estudio:
 - Cuando quiera.
 - Sin tener que dar explicaciones.
 - Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

El participante desea que le comuniquen la información derivada de la investigación que pueda ser relevante para su salud:

- SÍ
- NO

El participante consiente el almacenamiento y uso de las muestras biológicas sobrantes y de los datos asociados para futuras investigaciones.

- SÍ (En este caso se le proporcionará una hoja de información al paciente y consentimiento informado adicional del Biobanco CIBERER)
- NO

El participante consiente el ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales.

- SÍ
- NO

FIRMA del Testigo FECHA: _____ <i>(Nombre, firma y fecha de puño y letra por el testigo)</i>	FIRMA del Investigador <i>(Persona que obtiene el Consentimiento)</i> FECHA: _____
---	---

El participante del estudio ha indicado que no puede leer /escribir.

Un miembro del personal del estudio le ha leído el documento de consentimiento, lo ha revisado y comentado con el participante y se le ha concedido la oportunidad de hacer preguntas o consultarlo con otras personas. El testigo ha de ser una persona imparcial, ajena al estudio.

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PADRE/ MADRE/ REPRESENTANTE LEGAL

Título del estudio: “ESTUDIO OBSERVACIONAL AMBISPECTIVO PARA LA VALIDACIÓN CLÍNICA A PEQUEÑA ESCALA DE LA FUNCIÓN PRONÓSTICO DEL TEST ScolioPro® A PARTIR DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE ESCOLIOSIS IDIOPÁTICA ADOLESCENTE (EIA), CON RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS DESDE EL MOMENTO DE DIAGNÓSTICO”.

Código del estudio: E.01

Promotor: EpiDisease S. L.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: _____

CENTRO: _____

Introducción

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación sobre Escoliosis Idiopática Adolescente, al que invitamos a participar a su hijo porque se le ha diagnosticado la enfermedad. En esta hoja de información se le explican los aspectos esenciales del estudio para ayudarle a decidir si desea que su hijo participe en el mismo.

Ponemos en su conocimiento que, cuando las condiciones de su hijo lo permitan y, en todo caso, si tiene doce o más años, éste también recibirá una hoja de información al paciente y un consentimiento informado, ambos redactados en un vocabulario comprensible a su nivel de entendimiento, que deberá firmar si asiente en participar en el estudio. Debe saber que la negativa de su hijo será respetada y en ese caso no se incluirá en el estudio.

El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación con medicamentos (CEIm) del Hospital Universitario Dr. Peset, de acuerdo a la legislación vigente (Ley 14/2007, de 3 de julio de Investigación Biomédica) sobre proyectos de investigación sobre seres humanos o su material biológico, y se llevará a cabo con respeto a los principios enunciados en la declaración del Helsinki para investigaciones médicas en seres humanos.

Por favor, lea esta hoja informativa con atención y plantee al médico participante en el estudio o a sus colaboradores cualquier pregunta o cuestión que no entienda. No firme el consentimiento informado a menos que esté satisfecho con las respuestas y desee que su hijo participe en este estudio. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

Voluntariedad

Debe saber que la participación de su hijo en este estudio es voluntaria y tanto usted como él pueden decidir que no participe o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento sin necesidad de dar ninguna explicación o justificación sobre su motivo y sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en la atención sanitaria de su hijo.

Si usted o su hijo desearan que su hijo abandonase la participación en el estudio en algún momento, por favor, notifíquesele al médico responsable del estudio en su centro

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Este estudio incluirá 50 pacientes adolescentes de dos hospitales de València diagnosticados de Escoliosis Idiopática Adolescente. A estos pacientes se les tomarán un total de tres muestras sanguíneas durante el estudio. Además, durante el transcurso del estudio (duración total de 18 meses) se extraerán de la Historia clínica los datos clínicos que caracterizan la Escoliosis Idiopática Adolescente, y que han sido registrados desde el diagnóstico y hasta el cierre del estudio.

Se medirán determinados biomarcadores (son sustancias utilizadas como indicadores de un estado biológico) en las muestras sanguíneas, usando para ello un test de diagnóstico *in vitro* denominado “ScolioPro®”. Se estudiará la correlación de los biomarcadores con los datos clínicos con el fin de estudiar la capacidad del test ScolioPro® de predecir el riesgo de evolución de la escoliosis. Si en un futuro el test fuera válido para pronosticar la evolución de la enfermedad, se evitarían las repetidas exposiciones a los rayos X a las que debe someterse un paciente en la práctica clínica actual para la monitorización y seguimiento de la escoliosis.

El test Scolipro todavía no se encuentra comercializado. Si tras este estudio se valida su función pronóstica, el promotor procederá a solicitar las autorizaciones necesarias para que este test pueda ser comercializado.

Objetivo del estudio

El objetivo de este estudio es identificar si existe correlación entre los biomarcadores medidos en las muestras sanguíneas, con ayuda del test Scolipro®, y las variables clínicas que se están incluidas en la historia clínica para describir el curso de la Escoliosis Idiopática Adolescente, desde su diagnóstico hasta el momento de cierre del estudio (18 meses), y así comprobar si el test Scolipro® es válido para predecir la evolución clínica de la escoliosis.

Procedimientos del estudio

Su hijo será incluido en el estudio si cumple los criterios de inclusión, y tras la firma del consentimiento informado.

La participación de su hijo en este estudio conlleva la obtención y utilización de muestras biológicas con fines de investigación, para lo que se observará además de la Ley 14/2007 de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, normativas que garantizan el respeto a sus derechos. Al firmar este documento, usted acepta que se utilicen las muestras de su hijo para las finalidades del presente estudio.

Estas muestras serán depositadas en la colección de muestras específica para el estudio en el Biobanco del Centro de Investigación Biomédica en Red- Enfermedades Raras (CIBERER) (Instituto de Salud Carlos III), ubicado en el Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP) de València.

Además, Ud y su hijo podrán manifestar su voluntad de ceder las muestras sobrantes de este estudio para futuras investigaciones al Biobanco CIBERER mediante la firma del Consentimiento Informado del Biobanco, de lo contrario, las muestras serán destruidas.

Las muestras sanguíneas le serán tomadas a su hijo por venopunción en el Centro Hospitalario y serán procesadas para separar el plasma sanguíneo. Las muestras serán depositadas para su custodia en una colección de muestras para el estudio en el Biobanco CIBERER para asegurar la calidad, la trazabilidad y el mantenimiento en óptimas condiciones de las muestras recogidas. Posteriormente, los investigadores de este proyecto tendrán que solicitar las muestras al Biobanco CIBERER para poder analizarlas con el test Scolipro® en los laboratorios de investigación.

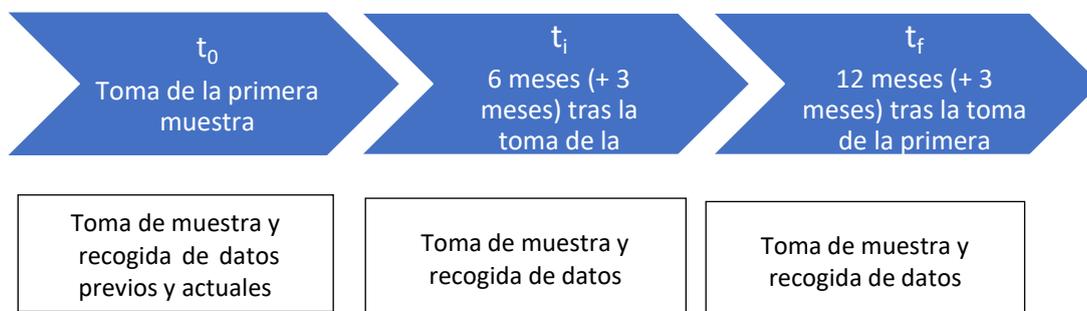
Para el estudio se tomarán muestras (8 ml de sangre) en tres momentos temporales:

- 1ª Muestra (es posible que ya esté disponible en el biobanco CIBERER).
- A los 6 meses tras la primera muestra.
- A los 12 meses tras la primera muestra.

El seguimiento de su hijo durante este estudio implica también la recogida de los datos referentes a la enfermedad en estudio, que han sido plasmados en su historia clínica desde el diagnóstico y durante aproximadamente los 18 meses posteriores a la inclusión en el estudio.

No está previsto que su hijo realice visitas adicionales a las que realizaría si no participara en el estudio.

En la siguiente tabla le mostramos un calendario con un esquema de la información que se recogería durante el estudio.



Incomodidades y riesgos derivados del estudio

El procedimiento que se propone no supone ningún riesgo añadido para la salud ni compromete el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad.

La extracción de sangre apenas tiene efectos secundarios; para la mayoría de las personas las punciones con agujas para la extracción de sangre no suponen ningún problema. Lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 ó 2 días y en ocasiones pueden provocar hemorragias, molestias, infecciones y/o dolor en el punto de extracción de sangre. También puede sentirse mareado.

Es posible que sea necesario algún dato o muestras adicionales. En ese caso, el médico del estudio se pondrá en contacto con usted para solicitar de nuevo la colaboración de su hijo. Se le informará de los motivos y se le solicitará de nuevo su consentimiento.

Además, en el procedimiento hay un registro de datos, que no supondrá ningún riesgo para su hijo/a. La información recogida se mantendrá de forma confidencial como se explica más adelante.

Beneficios esperados

Es posible que la participación de su hijo en este estudio no implique ningún beneficio médico directo para él/ella.

No percibirán ningún beneficio económico por la donación de las muestras y la cesión de los datos proporcionados, ni tendrán derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación efectuada.

Es posible que al contribuir al desarrollo y validación del test ScolioPro® pueda ayudar en el futuro al pronóstico de la enfermedad y con ello a un tratamiento precoz y personalizado según el riesgo de progresión de la escoliosis.

Advertencia relativa al embarazo y lactancia

El estudio no permite la participación de embarazadas o madres lactantes. Si su hija se quedara embarazada durante el transcurso de su participación, por favor informe al médico del estudio.

Gastos y compensación económica

El promotor del estudio es el responsable de gestionar la financiación del mismo. Para la realización del estudio el promotor ha firmado un contrato con el centro donde se va a realizar y con el médico del estudio. Tanto el centro como el investigador recibirán una compensación económica por la realización del estudio.

La participación de su hijo en este estudio no le supondrá ningún gasto adicional a la práctica clínica habitual.

Confidencialidad y protección de datos personales

El promotor se compromete al cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal y al Real Decreto que la desarrolla (RD 1720/2007). Así como el Reglamento Europeo 2016/679 de 27 de abril de 2016 de Protección de datos (RGPD). Por ello es importante que conozca la siguiente información.

El promotor adoptará las medidas pertinentes para garantizar la protección de la privacidad de su hijo y no permitirá que sus datos se crucen con otras bases de datos que pudieran permitir su identificación. Tanto el centro como el promotor son responsables respectivamente del tratamiento de sus datos y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos en vigor. Las muestras recogidas para el estudio estarán identificadas mediante códigos del promotor y del Biobanco y los datos clínicos se recogerán de forma codificada, de manera que no se incluya información que pueda identificar a su hijo, y sólo el médico del estudio/colaboradores podrán relacionar dichos datos con su hijo y con su historia clínica. Por lo tanto, la identidad de su hijo no será revelada a ninguna otra persona salvo a las autoridades sanitarias, cuando así lo requieran o en caso de urgencia médica. Los Comités de Ética de la Investigación, los representantes de la Autoridad Sanitaria en materia de inspección (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios) y el personal autorizado por el Promotor (monitores del estudio, auditores), únicamente podrán acceder para comprobar los datos personales, los procedimientos del estudio clínico y el cumplimiento de las normas de buena práctica clínica (siempre manteniendo la confidencialidad de la información). El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los participantes se ajustarán a lo dispuesto en esta ley.

Los datos se recogerán en un fichero de investigación responsabilidad de la institución y se tratarán en el marco de la participación de su hijo en este estudio.

De acuerdo a lo que establece la legislación de protección de datos, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Además de estos derechos, usted también puede limitar el tratamiento de los datos de su hijo que sean incorrectos, solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad) los datos que usted ha facilitado de su hijo para el estudio. Para ejercitar estos derechos, diríjase al investigador principal del estudio o al Delegado de Protección de Datos del centro (si aplica) en:

_____ (Incluir Dirección/ contacto en los centros que dispongan de esta figura).

Si usted decide retirar el consentimiento para la participación de su hijo en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos ni ninguna muestra adicional será tomada, pero sí se utilizarán los datos que ya se hayan recogido hasta ese momento para los fines solicitados. Le recordamos que los datos no se pueden eliminar aunque su hijo deje de participar en el estudio para garantizar la validez de la investigación y cumplir con los deberes legales. Así mismo, tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no quedara satisfecho.

Si realizáramos transferencia de los datos codificados de su hijo fuera de la UE, a las entidades de nuestro grupo, a prestadores de servicios o a investigadores científicos que colaboren con nosotros, los datos del paciente quedarán protegidos con salvaguardas tales como contratos y otros mecanismos por las autoridades de protección de datos. Si usted quiere saber más al respecto, puede contactar al/ la Delegado/ a de Protección de Datos del promotor (<http://www.epidisease.com/es/contacto/>).

Otra información relevante

Cualquier nueva información que se genere durante el estudio y que pueda afectar a su disposición para la continuidad de la participación de su hijo en el estudio le será comunicada por el médico de su hijo lo antes posible.

También debe saber que su hijo puede ser excluido del estudio si el promotor o los investigadores del estudio lo consideran oportuno. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo que ha ocasionado su retirada del estudio

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a que su hijo cumpla con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

Debe usted saber que es posible que su médico de Atención Primaria tenga conocimiento de su participación en este estudio.

Asimismo, debe saber que se garantiza al menor el acceso a la información relativa a la utilización de su muestra cuando éste alcance la mayoría de edad.

En el caso de que en este estudio se obtengan datos que pudieran ser clínica o genéticamente relevantes para su hijo, e interesar a su salud o a la de su familia, podrá solicitar que le sean comunicados por su médico del estudio si así lo indica en la casilla que aparece al final de este documento. No obstante, si hubiera indicado su negativa y cuando esta información, según criterio del médico responsable, sea necesaria para evitar un grave perjuicio para la salud de su hijo o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar próximo o a un representante, previa consulta al Comité de Ética Asistencial del centro. La comunicación de esta información se llevará a cabo por profesionales que le podrán explicar adecuadamente su relevancia y las opciones que se pudieran plantear. En caso de información genética clínicamente relevante podrá recibir el preceptivo consejo genético.

Al ser el donante menor de edad, llegada la mayoría de edad tendrá derecho a recibir esta información y a la revocación del consentimiento. En caso de que no lo ejerza, se considerará que el actual documento sigue vigente.

Contacto en caso de dudas

Si durante la participación de su hijo tiene alguna duda o necesita obtener más información, póngase en contacto con _____ (Nombre y servicio Médico del estudio), en el teléfono _____ (teléfono de contacto). A través de este contacto usted podrá ejercitar sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, solicitando el formulario correspondiente. En dicho escrito, deberá adjuntar copia de su DNI para que el Centro responsable de sus datos pueda comprobar su identidad.

CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LOS PADRES

Título del estudio: "ESTUDIO OBSERVACIONAL AMBISPECTIVO PARA LA VALIDACIÓN CLÍNICA A PEQUEÑA ESCALA DE LA FUNCIÓN PRONÓSTICO DEL TEST ScolioPro® A PARTIR DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE ESCOLIOSIS IDIOPÁTICA ADOLESCENTE (EIA), CON RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS DESDE EL MOMENTO DE DIAGNÓSTICO".

Código del estudio: E.01

Promotor: EpiDisease S. L.

Tanto a mí como a mi hijo/a se nos ha explicado el objetivo de este estudio, los procedimientos que se van a seguir y los riesgos y beneficios que conlleva.

- He leído la hoja de información que se me ha entregado y permito que mi hijo/a participe en este estudio, entendiendo que puedo retirar a mi hijo/a del mismo en cualquier momento.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio y he recibido suficiente información sobre el estudio.
- He hablado con _____

(nombre y apellidos del investigador/persona que obtiene el Consentimiento)

A mi hijo/a también se le ha explicado el estudio, ha podido formular preguntas y ha recibido respuestas sobre aquello que no comprendía y da su consentimiento para participar en el mismo.

- Se me ha comunicado que se me proporcionará una copia firmada y fechada de este consentimiento

Con la firma de este consentimiento, decido voluntariamente que mi hijo/a participe en este estudio.

Deseo que me comuniquen la información derivada de la investigación que pueda ser relevante para la salud de mi hijo:

- SÍ
- NO

Consiento al almacenamiento y uso de las muestras biológicas sobrantes de mi hijo y de los datos asociados para futuras investigaciones.

- SÍ (En este caso se le proporcionará una hoja de información al paciente y consentimiento informado adicional del Biobanco CIBERER)
- NO

Consiento a ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales de mi hijo.

- SÍ
- NO

<p>FIRMA de LOS PROGENITORES (AMBOS) Ambos progenitores deben firmar este formulario. En caso de que autorice solo uno de los progenitores, el progenitor que autoriza declara (elijan sólo una opción):</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Confirmando con la presente que el otro progenitor no se opone a la participación de nuestro hijo/a en el estudio. <input type="checkbox"/> El firmante es el único tutor legal. 	<p>FIRMA del Investigador (Persona que obtiene el Consentimiento) FECHA: _____</p> <p>_____</p> <p><i>(Nombre completo, firma y fecha de puño y letra por el investigador)</i></p>
<p>FIRMA DEL PROGENITOR/TUTOR 1</p> <p>FECHA: _____</p> <p>_____</p> <p><i>(Nombre completo, firma y fecha de puño y letra por el PROGENITOR)</i></p>	<p>FIRMA del PROGENITOR/TUTOR 2</p> <p>FECHA: _____</p> <p>_____</p> <p><i>(Nombre completo, firma y fecha de puño y letra por el PROGENITOR)</i></p>

CONSENTIMIENTO INFORMADO ORAL ANTE TESTIGOS

Título del estudio: “ESTUDIO OBSERVACIONAL AMBISPECTIVO PARA LA VALIDACIÓN CLÍNICA A PEQUEÑA ESCALA DE LA FUNCIÓN PRONÓSTOCO DEL TEST ScolioPro® A PARTIR DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE ESCOLIOSIS IDIOPÁTICA ADOLESCENTE (EIA), CON RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS DESDE EL MOMENTO DE DIAGNÓSTICO”.

Código del estudio: E.01

Promotor: EpiDisease S. L.

Yo, _____ **NOMBRE COMPLETO DEL TESTIGO (nombre y apellidos)** como testigo, afirmo que en mi presencia se ha informado a _____ **NOMBRE COMPLETO DEL PADRE/MADRE/ REPRESENTANTE LEGAL DEL PACIENTE** _____ **(nombre y apellidos)**; y se ha leído la hoja de información que se le ha entregado sobre el estudio, de modo que:

- Ha recibido la hoja de información al paciente y consentimiento Informado sobre el estudio firmada y fechada.
- Ha podido hacer preguntas sobre el estudio.
- Ha recibido suficiente información sobre el estudio.
- Ha sido informado por _____ **(nombre y apellidos del investigador/persona que obtiene el Consentimiento)**
- Comprende que la participación de su hijo es voluntaria.
- Comprende que puede retirar el consentimiento sobre la participación de su hijo en el estudio:
 - Cuando quiera.
 - Sin tener que dar explicaciones.
 - Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

El padre/ madre/ representante legal del participante desea que le comuniquen la información derivada de la investigación que pueda ser relevante para la salud de su hijo:

- SÍ
- NO

El padre/ madre/ representante legal del participante consiente el almacenamiento y uso de las muestras biológicas sobrantes de su hijo y de los datos asociados para futuras investigaciones.

- SÍ (En este caso se le proporcionará una hoja de información al paciente y consentimiento informado adicional del Biobanco CIBERER)
- NO

El padre/ madre/ representante legal del participante consiente el ser contactado en el caso de necesitar más información o muestras biológicas adicionales de su hijo.

- SÍ
- NO

FIRMA del Testigo FECHA: _____ <i>(Nombre, firma y fecha de puño y letra por el testigo)</i>	FIRMA del Investigador (Persona que obtiene el Consentimiento) FECHA: _____
---	--

El padre/ madre/ representante legal del participante del estudio ha indicado que no puede leer /escribir.

Un miembro del personal del estudio le ha leído el documento de consentimiento, lo ha revisado y comentado con el padre/ madre/ representante legal del participante y se le ha concedido la oportunidad de hacer preguntas o consultarlo con otras personas. El testigo ha de ser una persona imparcial, ajena al estudio.

ANEXO 5



FPNT-CEIB-04 (B)

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS

Dña. Adela Cañete Nieto, presidenta del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del **Hospital Universitario y Politécnico La Fe**,

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado en su sesión de fecha **27 de junio de 2018**, el Proyecto de Investigación:

Título: **“ESTUDIO OBSERVACIONAL AMBISPECTIVO PARA LA VALIDACIÓN CLÍNICA A PEQUEÑA ESCALA DE LA FUNCIÓN PRONÓSTICO DEL TEST SCOLIPRO® A PARTIR DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE ESCOLIOSIS IDIOPÁTICA ADOLESCENTE (EIA), CON RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS DESDE EL MOMENTO DE”**

Código de protocolo: **E.01**

Promotor: **EPIDISEASE S. L.**

Versión/fecha de la memoria del proyecto: **1.0/ 4 de abril de 2018**

Versión/fecha de la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado:

- **HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MENORES, Versión 1.0, de 29-Mar-2018**
- **HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PADRE/ MADRE/ REPRESENTANTE LEGAL, Versión 1.0, de 29-Mar-2018**
- **HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO, Versión 1.0, de 29-Mar-2018**

Que dicho proyecto se ajusta a las normativas éticas sobre investigación biomédica con sujetos humanos y es viable en cuanto al planteamiento científico, objetivos, material y métodos, etc, descritos en la solicitud, así como la Hoja de Información al Paciente y el Consentimiento Informado.

En consecuencia, este Comité acuerda emitir **INFORME FAVORABLE** de dicho Proyecto de Investigación que será realizado en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe por el/la **Dr. / Dra. Teresa Bas Hermida** del servicio/unidad/grupo de investigación de **CIRUGÍA ORTOPÉDICA Y TRAUMATOLOGÍA** como Investigador Principal.

Que el CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, tanto en su composición como en sus procedimientos, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm del Hospital Universitario y Politécnico La Fe es la indicada en el anexo 1, teniendo en cuenta que, en el caso de que algún miembro participe en el estudio o declare algún conflicto de interés, no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del estudio clínico.

FPNT-CEIB-04 (B)

Lo que firmo en Valencia, a 27 de junio de 2018



Fdo.: Dra. Adela Canete Nieto
Presidenta del Comitè de Ètica de la Investigació amb medicaments

ANEXO I **COMPOSICIÓN CEIm**

Presidente:

Dra. Adela Cañete Nieto (Oncología Pediátrica)

Vicepresidente:

Dr. Salvador Aliño Pellicer (Catedrático Farmacólogo Clínico)

Secretaria Técnica:

Dra. María Tordera Baviera (Farmacéutica del Hospital)

Miembros:

Dr. Bonaventura Casanova Estruch (Neurología)

Dra. M^a Isabel Izquierdo Macián (Neonatología)

Dr. Luis Vicente Martínez Dolz (Cardiología)

Dra. Paula Ramírez Galleymore (Medicina Intensiva - Miembro de la Comisión de Investigación)

Dra. Sara Brugger Frigols (Radiodiagnóstico)

D. Serafín Rodríguez Capellán (Licenciado en derecho - Ajeno a las profesiones sanitarias)

Dña. María Victoria Paricio Gómez (Enfermería)

Dr. José María Canelles Gamir (Farmacéutico de Atención Primaria)

Dr. Matteo Frasson (Cirugía General y Aparato Digestivo)

Dr. José Vicente Solanas Prats (Atención Primaria)

Dña. Pilar Robles Villalba (Vicepresidenta de la asociación de Miastenia - Miembro ajeno a las profesiones sanitarias)

Dr. Javier Lluna González (Cirugía Pediátrica - Miembro del Comité de Ética Asistencial - Formación acreditada en Bioética)

D. Miguel Ángel Cano Torres (Secretario de ASLEUVAL - Miembro Lego - Ajeno a las profesiones sanitarias)

Código de protocolo: E.01

Promotor: EpiDisease S.L.

Título: “Estudio observacional ambispectivo para la validación clínica a pequeña escala de la función pronóstico del test Scolipro® a partir de pacientes diagnosticados de escoliosis idiopática adolescente (EIA), con recogida de datos clínicos desde el momento de diagnóstico”

Protocolo: versión 2.0 del 30/07/2018

HIP-CI mayor de edad: v 2.0 de 31/07/2018

Hoja de Información al Paciente y consentimiento informado

Padres/tutor: 2.0 de 31/07/2018

Hoja de Información al Paciente y consentimiento informado menores:
v. 2.0 de 31/07/2018

**DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CON
MEDICAMENTOS (CEIm) DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO
DOCTOR PESET DE VALENCIA**

**D^a. Pilar Codoñer Franch, Presidenta del Comité Ético de
Investigación con Medicamentos del Hospital Universitario Doctor
Pezet de Valencia**

CERTIFICA:

Que este Comité, en la reunión ordinaria celebrada el día 29 de agosto de 2018, ha evaluado la propuesta del promotor, EpiDisease S.L., para que se evalúe el protocolo del estudio arriba referenciado.

Y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.

La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Son adecuados el procedimiento para obtener el consentimiento informado, y el modo de reclutamiento previsto, así como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.

Que las compensaciones económicas no interfieren con el respeto a los postulados éticos.

Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Orden SAS 3470/2009 y la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa aplicable en función de las características del estudio.

Que en la precitada reunión y tras el estudio del protocolo, este Ceic emite un Dictamen Favorable a la realización del estudio en el Centro y con el **Dr. Antonio Martín** del Servicio de COT como investigador principal.

Valencia 18 de septiembre de 2018

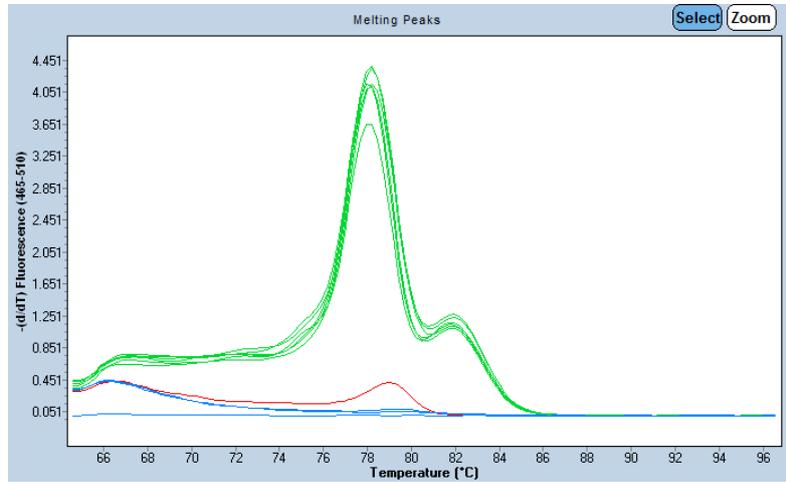
Fdo.: Dra. Pilar Codoñer Franch



ANEXO 6

miR-27a-5p

Especificidad de cebadores



Tm Calling for miR-27 (Tm Calling)

Results

Inc	Pos	Sample Name	Peak 1				Peak 2			
			Tm	Area	Width	Height	Tm	Area	Width	Height
<input checked="" type="checkbox"/>	E1	10 ⁷ copias	78.32	11.44	2.75	4.15	82.30	3.88	3.45	1.13
<input checked="" type="checkbox"/>	E2	10 ⁷ copias	78.31	11.71	2.69	4.36	82.30	4.35	3.52	1.24
<input checked="" type="checkbox"/>	E3	10 ⁷ copias	78.27	11.80	2.69	4.38	82.26	4.52	3.51	1.29
<input checked="" type="checkbox"/>	E4	10 ⁵ copias	78.20	11.15	2.74	4.07	82.30	3.70	3.35	1.10
<input checked="" type="checkbox"/>	E5	10 ⁵ copias	78.12	11.52	2.80	4.11	82.24	3.89	3.32	1.17
<input checked="" type="checkbox"/>	E6	10 ⁵ copias	78.15	9.73	2.69	3.62	82.23	4.12	3.44	1.20
<input checked="" type="checkbox"/>	E21	Blanco RT	79.71	0.58	1.77	0.33				
<input checked="" type="checkbox"/>	E22	Blanco RT								
<input checked="" type="checkbox"/>	E23	Blanco RT								
<input checked="" type="checkbox"/>	E24	Blanco qPCR								

Muestra

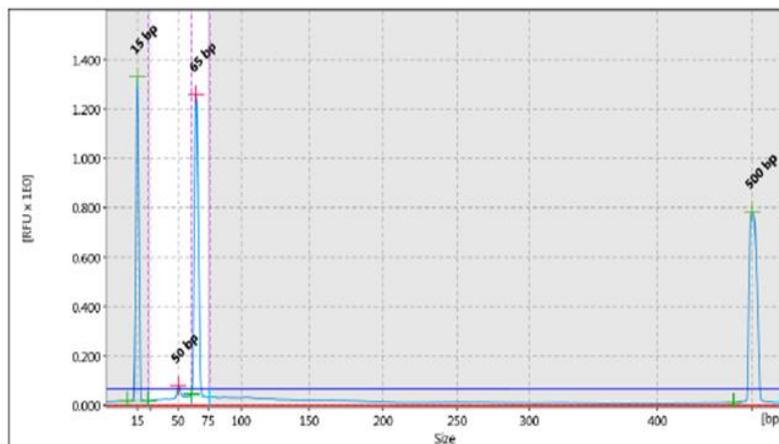


Figure: 11

NTC

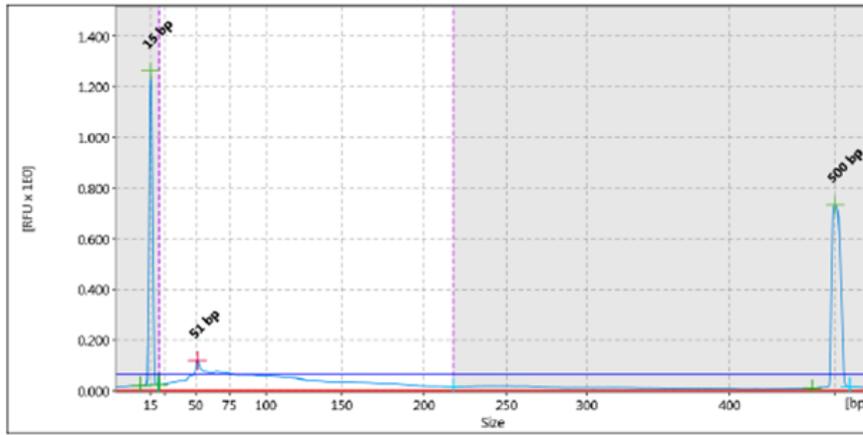
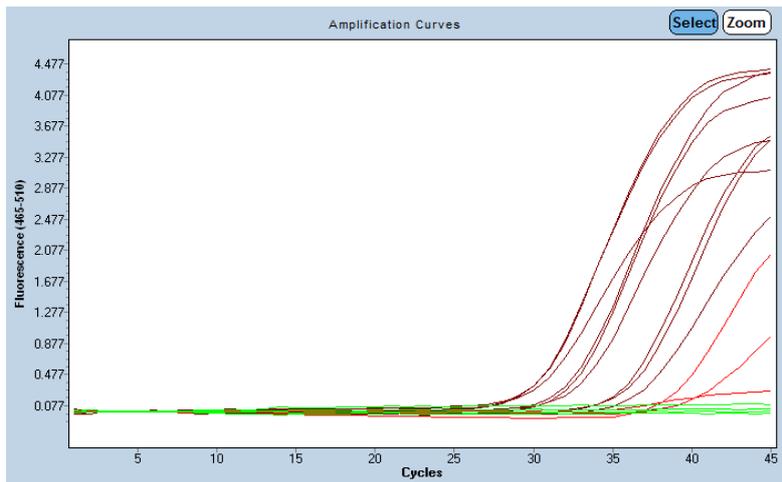


Figure: 23

Sensibilidad



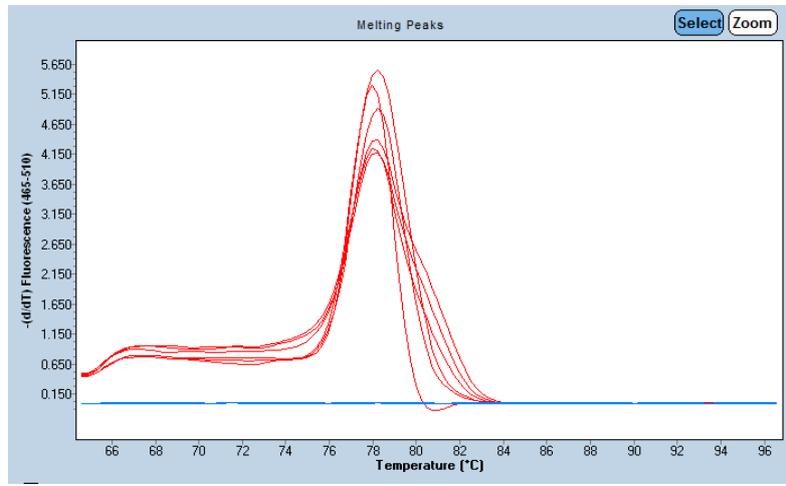
**Abs Quant/2nd Derivative Max for miR-27a (Abs Quant/2nd Derivative Max)
Results**

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	10 [^] 7 copias	Standard	30.61	
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	10 [^] 7 copias	Standard	30.45	
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	10 [^] 7 copias	Standard	30.52	
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	10 [^] 6 copias	Standard	32.59	
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	10 [^] 6 copias	Standard	32.96	
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	10 [^] 6 copias	Standard	32.50	
<input checked="" type="checkbox"/>	A7	10 [^] 5 copias	Standard	36.75	
<input checked="" type="checkbox"/>	A8	10 [^] 5 copias	Standard	36.42	
<input checked="" type="checkbox"/>	A9	10 [^] 5 copias	Standard	35.86	
<input checked="" type="checkbox"/>	A15	NTC	Negative Control	40.00	
<input checked="" type="checkbox"/>	A16	NTC	Negative Control	38.67	
<input checked="" type="checkbox"/>	A17	NTC	Negative Control	35.01	
<input checked="" type="checkbox"/>	A18	Sample 18	Unknown		
<input checked="" type="checkbox"/>	A22	Blanco qPCR	Negative Control		
<input checked="" type="checkbox"/>	A23	Blanco qPCR	Negative Control		
<input checked="" type="checkbox"/>	A24	Blanco qPCR	Negative Control		

> - Late Cp call (last five cycles) has higher uncertainty

miR-122-5p

Especificidad de cebadores

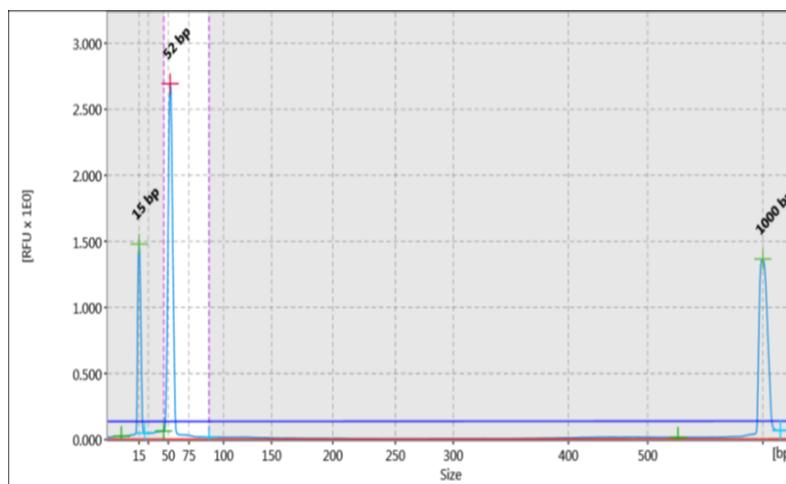


Tm Calling for miR-122 (Tm Calling)

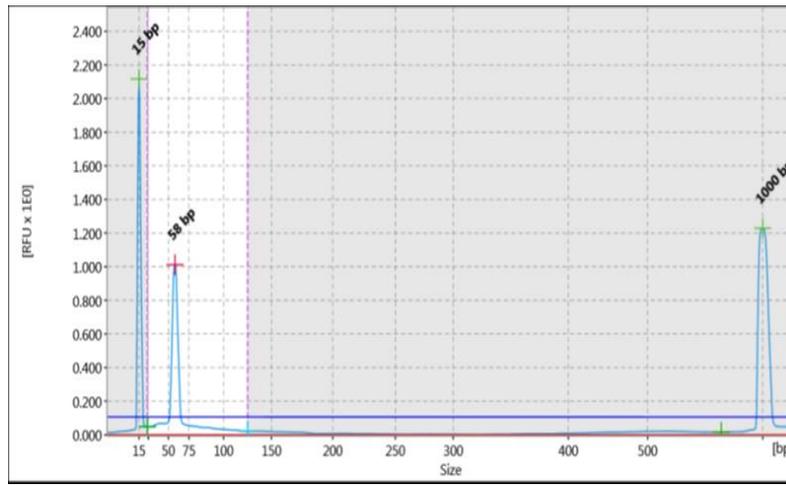
Results

Inc	Pos	Sample Name	Peak 1			
			Tm	Area	Width	Height
<input checked="" type="checkbox"/>	A1	10 ⁷ copias	78.45	15.20	3.73	4.07
<input checked="" type="checkbox"/>	A2	10 ⁷ copias	78.65	16.02	4.04	3.97
<input checked="" type="checkbox"/>	A3	10 ⁷ copias	78.74	17.63	4.24	4.16
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	10 ⁵ copias	78.39	14.57	2.93	4.98
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	10 ⁵ copias	78.03	12.21	2.25	5.43
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	10 ⁵ copias	78.41	17.35	3.08	5.64
<input checked="" type="checkbox"/>	A21	Blanco RT				
<input checked="" type="checkbox"/>	A22	Blanco RT				
<input checked="" type="checkbox"/>	A23	Blanco RT				
<input checked="" type="checkbox"/>	A24	Blanco qPCR				

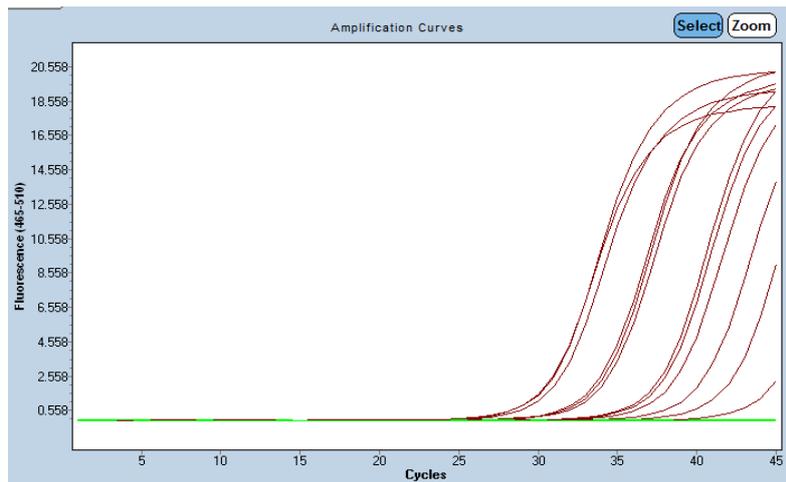
Muestra



NTC



Sensibilidad



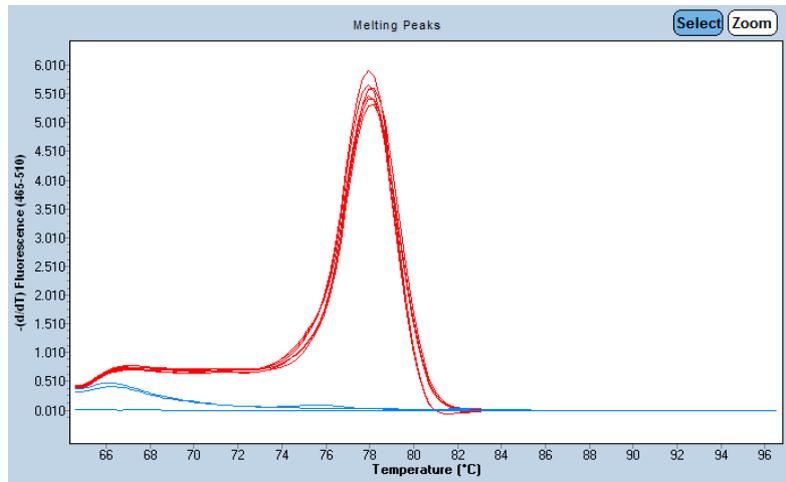
Abs Quant/2nd Derivative Max for miR-122 (Abs Quant/2nd Derivative Max) Results

Inc	Pos	Name	Type	CP
<input checked="" type="checkbox"/>	C10	10 ⁸ copias	Standard	30.26
<input checked="" type="checkbox"/>	C11	10 ⁸ copias	Standard	30.88
<input checked="" type="checkbox"/>	C12	10 ⁸ copias	Standard	30.57
<input checked="" type="checkbox"/>	C13	10 ⁷ copias	Standard	33.78
<input checked="" type="checkbox"/>	C14	10 ⁷ copias	Standard	33.54
<input checked="" type="checkbox"/>	C15	10 ⁷ copias	Standard	33.95
<input checked="" type="checkbox"/>	C16	10 ⁶ copias	Standard	37.41
<input checked="" type="checkbox"/>	C17	10 ⁶ copias	Standard	37.24
<input checked="" type="checkbox"/>	C18	10 ⁶ copias	Standard	38.23
<input checked="" type="checkbox"/>	C19	10 ⁵ copias	Standard	40.00
<input checked="" type="checkbox"/>	C20	10 ⁵ copias	Standard	40.00
<input checked="" type="checkbox"/>	C21	10 ⁵ copias	Standard	40.00
<input checked="" type="checkbox"/>	C22	Blanco RT	Negative Control	
<input checked="" type="checkbox"/>	C23	Blanco RT	Negative Control	
<input checked="" type="checkbox"/>	C24	Blanco qPCR	Unknown	

> - Late Cp call (last five cycles) has higher uncertainty

miR-223-5p (diseño 1)

Especificidad de cebadores

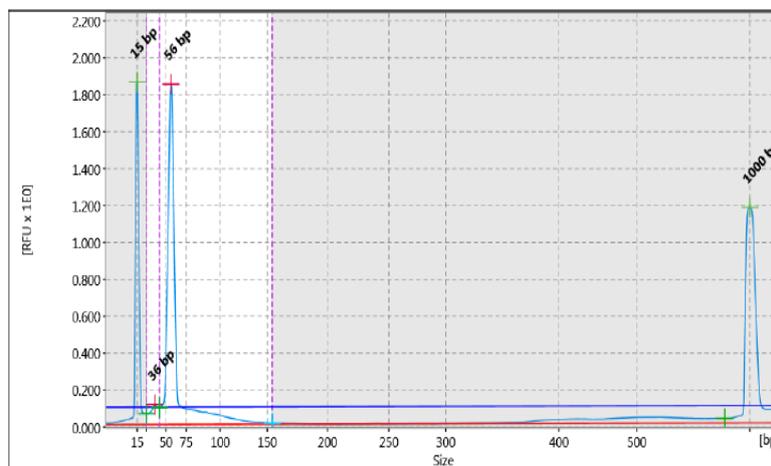


Tm Calling for miR-223 (Tm Calling)

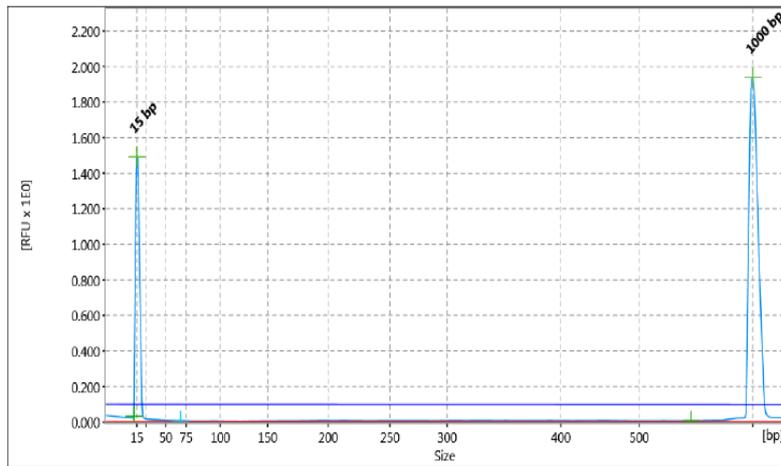
Results

Inc	Pos	Sample Name	Peak 1			
			Tm	Area	Width	Height
<input checked="" type="checkbox"/>	A4	10 ⁷ copias	78.20	17.51	3.07	5.71
<input checked="" type="checkbox"/>	A5	10 ⁷ copias	78.18	16.53	3.05	5.41
<input checked="" type="checkbox"/>	A6	10 ⁷ copias	78.15	16.81	3.05	5.52
<input checked="" type="checkbox"/>	A7	10 ⁵ copias	78.02	16.36	2.94	5.57
<input checked="" type="checkbox"/>	A8	10 ⁵ copias	78.01	17.50	2.89	6.05
<input checked="" type="checkbox"/>	A9	10 ⁵ copias	78.00	16.79	2.90	5.79
<input checked="" type="checkbox"/>	A22	Blanco RT				
<input checked="" type="checkbox"/>	A23	Blanco RT				
<input checked="" type="checkbox"/>	A24	Blanco qPCR				

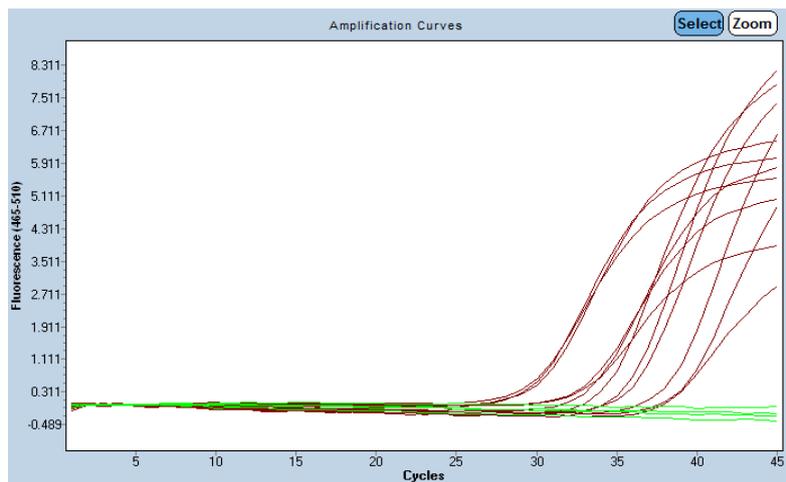
Muestra



NTC



Sensibilidad



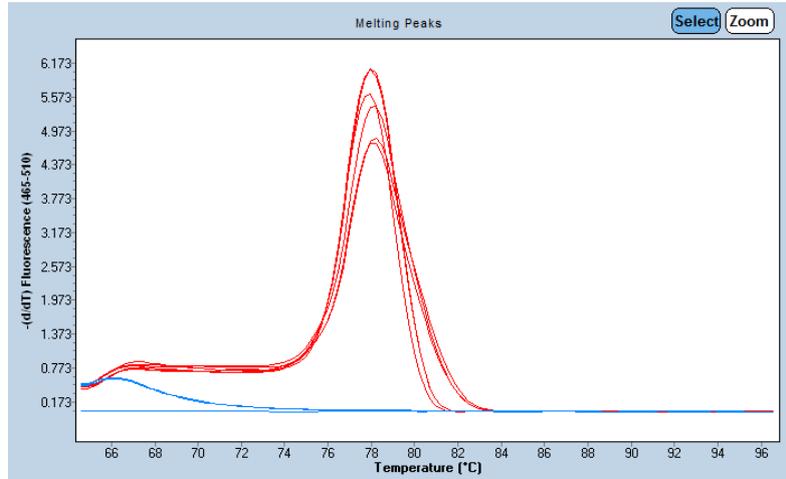
Abs Quant/2nd Derivative Max for miR223 (Abs Quant/2nd Derivative Max) Results

Inc	Pos	Name	Type	CP
<input checked="" type="checkbox"/>	E7	10 ⁸ copias	Standard	29.62
<input checked="" type="checkbox"/>	E8	10 ⁸ copias	Standard	29.75
<input checked="" type="checkbox"/>	E9	10 ⁸ copias	Standard	30.17
<input checked="" type="checkbox"/>	E10	10 ⁷ copias	Standard	33.19
<input checked="" type="checkbox"/>	E11	10 ⁷ copias	Standard	32.86
<input checked="" type="checkbox"/>	E12	10 ⁷ copias	Standard	32.74
<input checked="" type="checkbox"/>	E13	10 ⁶ copias	Standard	35.56
<input checked="" type="checkbox"/>	E14	10 ⁶ copias	Standard	35.96
<input checked="" type="checkbox"/>	E15	10 ⁶ copias	Standard	34.13
<input checked="" type="checkbox"/>	E16	10 ⁵ copias	Standard	38.02
<input checked="" type="checkbox"/>	E17	10 ⁵ copias	Standard	39.03
<input checked="" type="checkbox"/>	E18	10 ⁵ copias	Standard	37.66
<input checked="" type="checkbox"/>	C22	Blanco RT	Negative Control	
<input checked="" type="checkbox"/>	C23	Blanco RT	Negative Control	
<input checked="" type="checkbox"/>	C24	Blanco qPCR	Unknown	

> - Late Cp call (last five cycles) has higher uncertainty

miR-223-5p (diseño 2)

Especificidad de cebadores

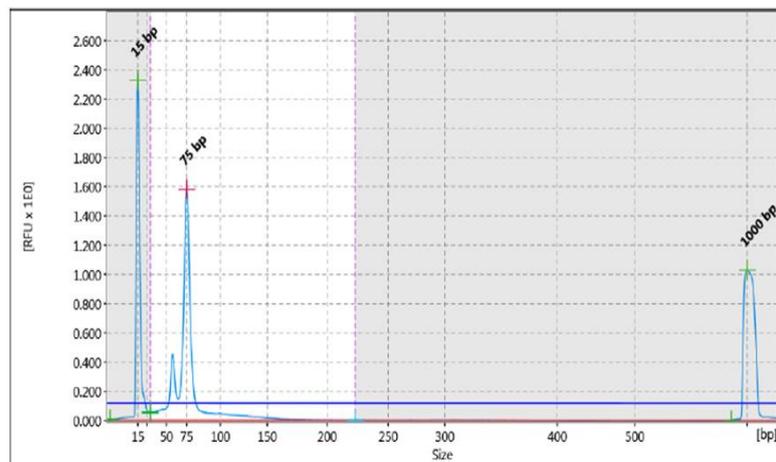


Tm Calling for miR-223 (Tm Calling)

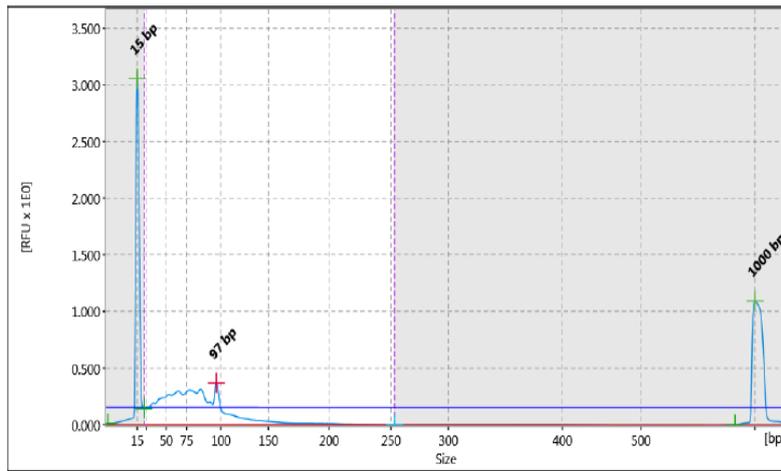
Results

Inc	Pos	Sample Name	Peak 1			
			Tm	Area	Width	Height
<input checked="" type="checkbox"/>	C1	10 ⁷ copias	78.53	17.86	3.78	4.73
<input checked="" type="checkbox"/>	C2	10 ⁷ copias	78.42	19.08	3.58	5.33
<input checked="" type="checkbox"/>	C3	10 ⁷ copias	78.43	17.04	3.65	4.66
<input checked="" type="checkbox"/>	C4	10 ⁵ copias	78.13	18.31	2.95	6.21
<input checked="" type="checkbox"/>	C5	10 ⁵ copias	77.97	16.46	2.87	5.74
<input checked="" type="checkbox"/>	C6	10 ⁵ copias	78.10	18.34	2.96	6.20
<input checked="" type="checkbox"/>	C21	Blanco RT				
<input checked="" type="checkbox"/>	C22	Blanco RT				
<input checked="" type="checkbox"/>	C23	Blanco RT				
<input checked="" type="checkbox"/>	C24	Blanco qPCR				

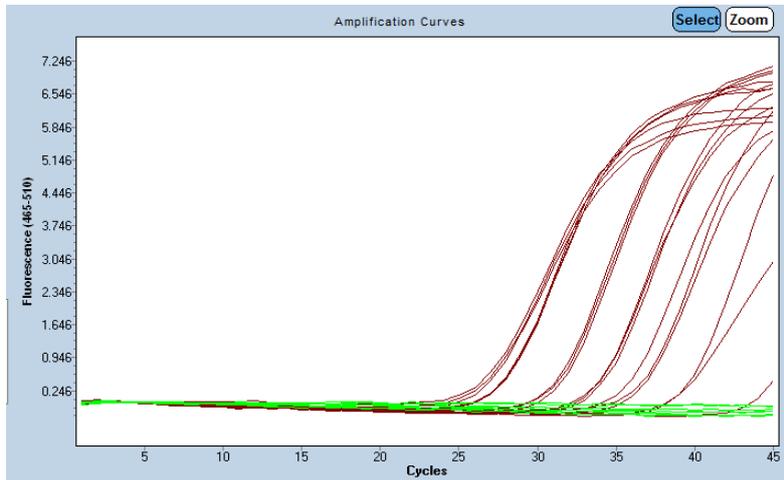
Muestra



NTC



Sensibilidad



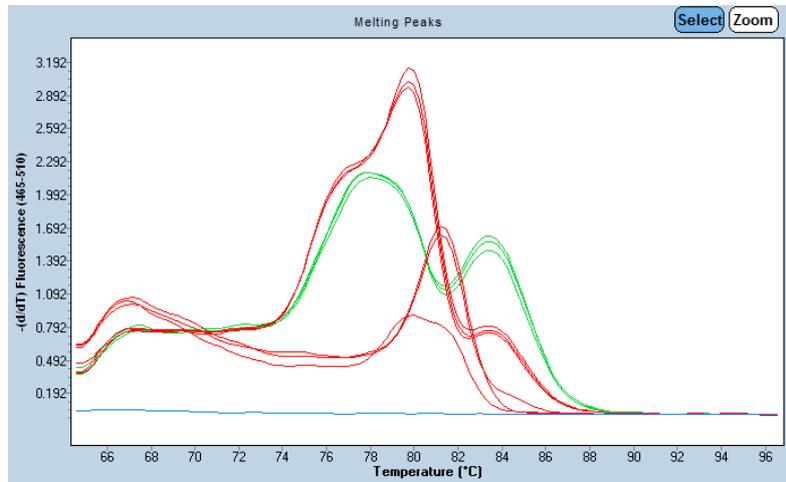
Abs Quant/2nd Derivative Max for mir223 (Abs Quant/2nd Derivative Max) Results

Inc	Pos	Name	Type	CP
<input checked="" type="checkbox"/>	C7	10 [^] 8 copias	Standard	31.01
<input checked="" type="checkbox"/>	C8	10 [^] 8 copias	Standard	31.18
<input checked="" type="checkbox"/>	C9	10 [^] 8 copias	Standard	31.29
<input checked="" type="checkbox"/>	C10	10 [^] 7 copias	Standard	33.63
<input checked="" type="checkbox"/>	C11	10 [^] 7 copias	Standard	33.89
<input checked="" type="checkbox"/>	C12	10 [^] 7 copias	Standard	33.69
<input checked="" type="checkbox"/>	C13	10 [^] 6 copias	Standard	36.61
<input checked="" type="checkbox"/>	C14	10 [^] 6 copias	Standard	36.48
<input checked="" type="checkbox"/>	C15	10 [^] 6 copias	Standard	35.57
<input checked="" type="checkbox"/>	C16	10 [^] 5 copias	Standard	40.00
<input checked="" type="checkbox"/>	C17	10 [^] 5 copias	Standard	38.94
<input checked="" type="checkbox"/>	C18	10 [^] 5 copias	Standard	40.00
<input checked="" type="checkbox"/>	C22	Blanco RT	Negative Control	
<input checked="" type="checkbox"/>	C23	Blanco RT	Negative Control	
<input checked="" type="checkbox"/>	C24	Blanco qPCR	Unknown	

> - Late Cp call (last five cycles) has higher uncertainty

miR-1306-3p

Especificidad de cebadores

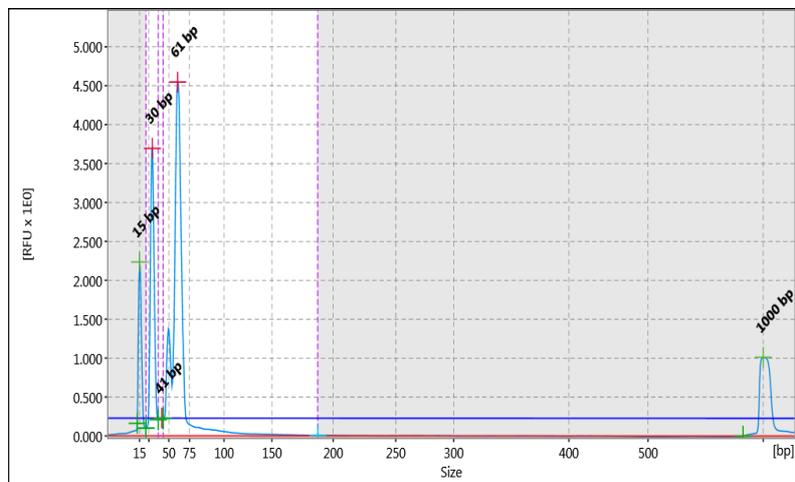


Tm Calling for miR-1306 (Tm Calling)

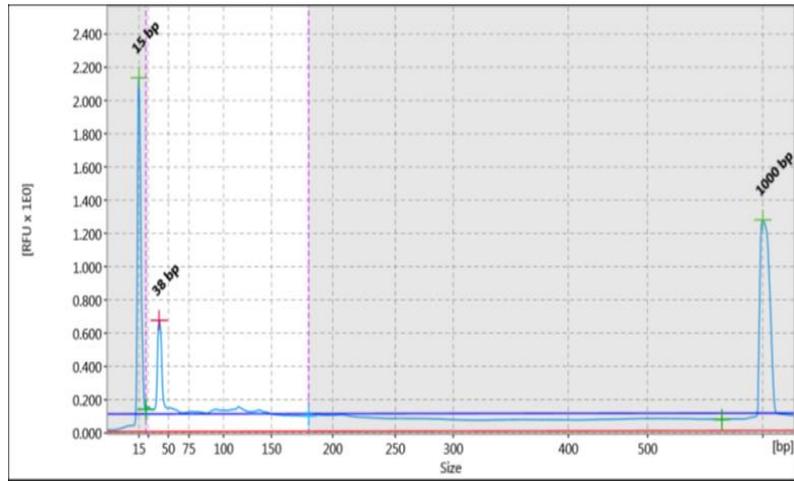
Results

Inc	Pos	Sample Name	Peak 1				Peak 2			
			Tm	Area	Width	Height	Tm	Area	Width	Height
<input checked="" type="checkbox"/>	I1	10 ⁷ copias	78.45	10.96	4.84	2.26	83.94	6.87	4.15	1.65
<input checked="" type="checkbox"/>	I2	10 ⁷ copias	78.49	10.44	4.73	2.21	83.95	7.53	4.25	1.77
<input checked="" type="checkbox"/>	I3	10 ⁷ copias	78.46	10.67	4.72	2.26	83.92	7.74	4.22	1.84
<input checked="" type="checkbox"/>	I4	10 ⁵ copias	79.25	17.51	6.40	2.74				
<input checked="" type="checkbox"/>	I5	10 ⁵ copias	79.34	17.65	6.38	2.77				
<input checked="" type="checkbox"/>	I6	10 ⁵ copias	79.40	18.16	6.46	2.81				
<input checked="" type="checkbox"/>	I21	Blanco RT	81.55	6.01	3.77	1.59				
<input checked="" type="checkbox"/>	I22	Blanco RT	81.03	5.34	5.66	0.94				
<input checked="" type="checkbox"/>	I23	Blanco RT	81.52	5.90	3.45	1.71				
<input checked="" type="checkbox"/>	I24	Blanco qPCR								

Muestra



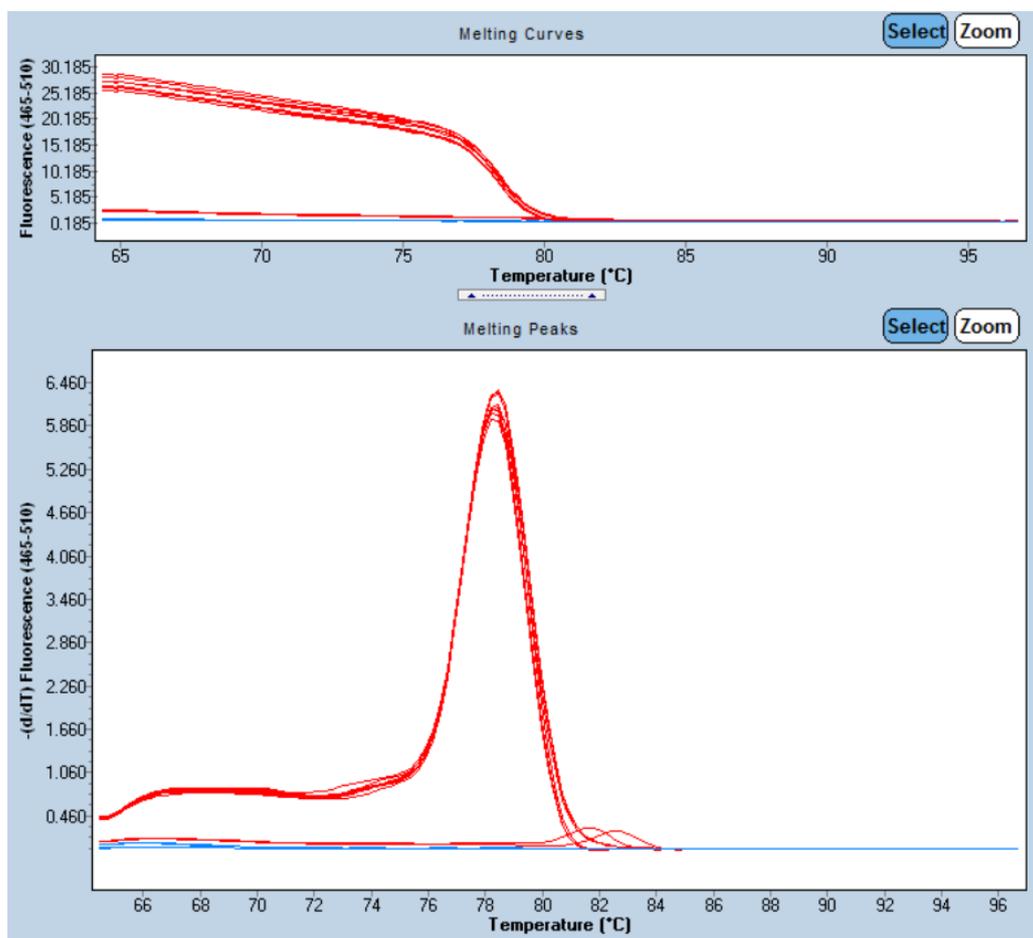
NTC



ANEXO 7

miR-122-5p Curvas de *melting*

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1	Ct
10 ⁷ copias RT1	78.48	18.42	2.85	6.45	28.15
10 ⁷ copias RT1	78.46	18.22	2.84	6.41	28.01
10 ⁷ copias RT2	78.43	17.69	2.85	6.21	27.99
10 ⁷ copias RT2	78.42	17.77	2.84	6.25	28.43
10 ⁵ copias RT1	78.37	16.57	2.66	6.23	36.07
10 ⁵ copias RT1	78.42	17.22	2.66	6.46	36.05
10 ⁵ copias RT2	78.36	16.43	2.66	6.18	36.22
10 ⁵ copias RT2	78.37	16.27	2.67	6.09	36.07
NTC RT1					
NTC RT1					
NTC RT2	82.85	0.31	1.77	0.18	40.00
NTC RT2	81.94	0.44	1.79	0.25	40.00
BqPCR					
BqPCR					



miR-122-5p Qiaxcel Condición 1

10⁷ copias

Sample Header			
Position:	A6	Plate ID:	C190804A02_2020-03-10_14-19-52, R: 1, E: 1
Run Date:	3/10/2020 2:19:52 PM		

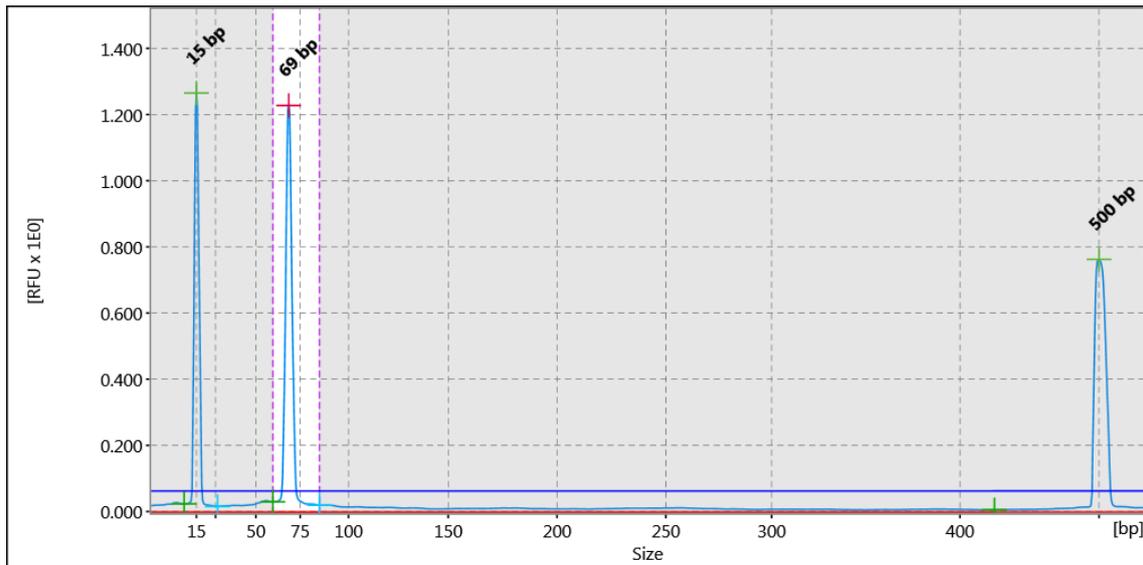


Figure:13

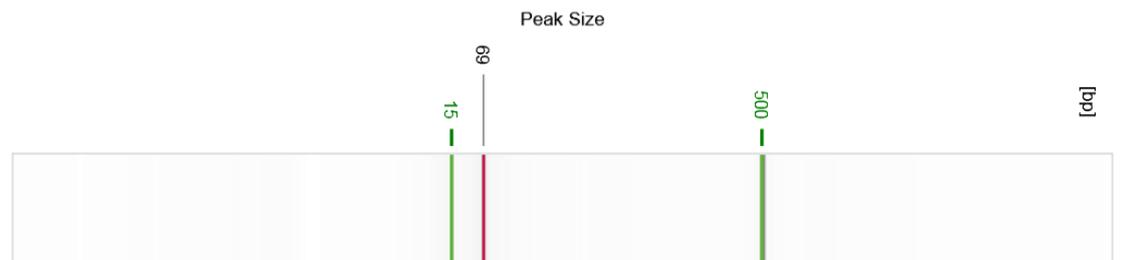


Figure:14

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV

10⁵ copias

Sample Header			
Position:	A12	Plate ID:	C190804A02_2020-03-10_14-19-52, R: 1, E: 1
Run Date:	3/10/2020 2:19:52 PM		

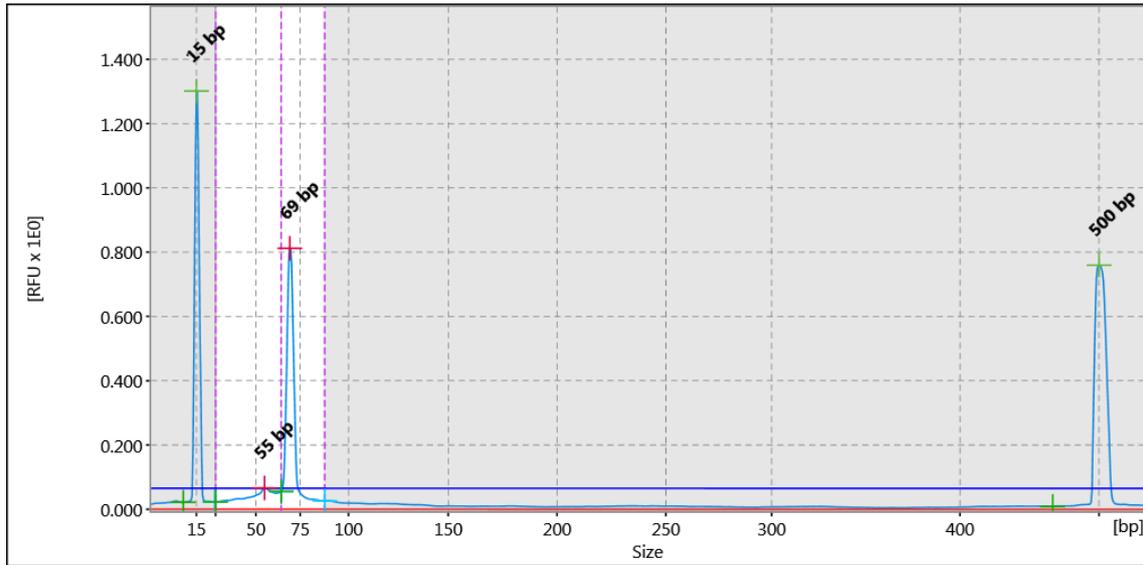


Figure: 25

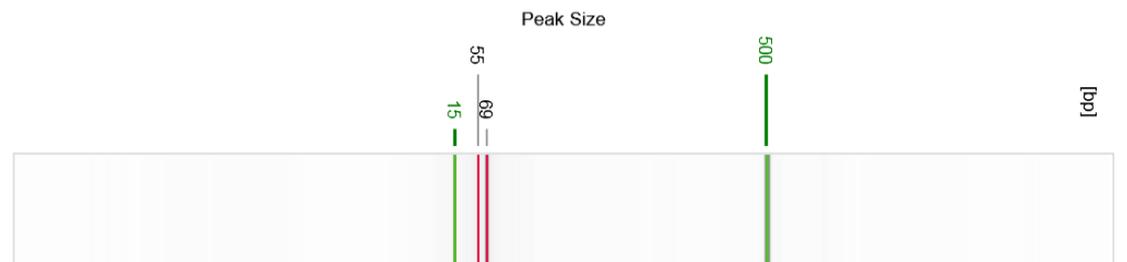


Figure:26

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

NTC

Sample Header			
Position:	B6	Plate ID:	C190804A02_2020-03-10_14-19-52, R: 1, E: 1
Run Date:	3/10/2020 2:19:52 PM		

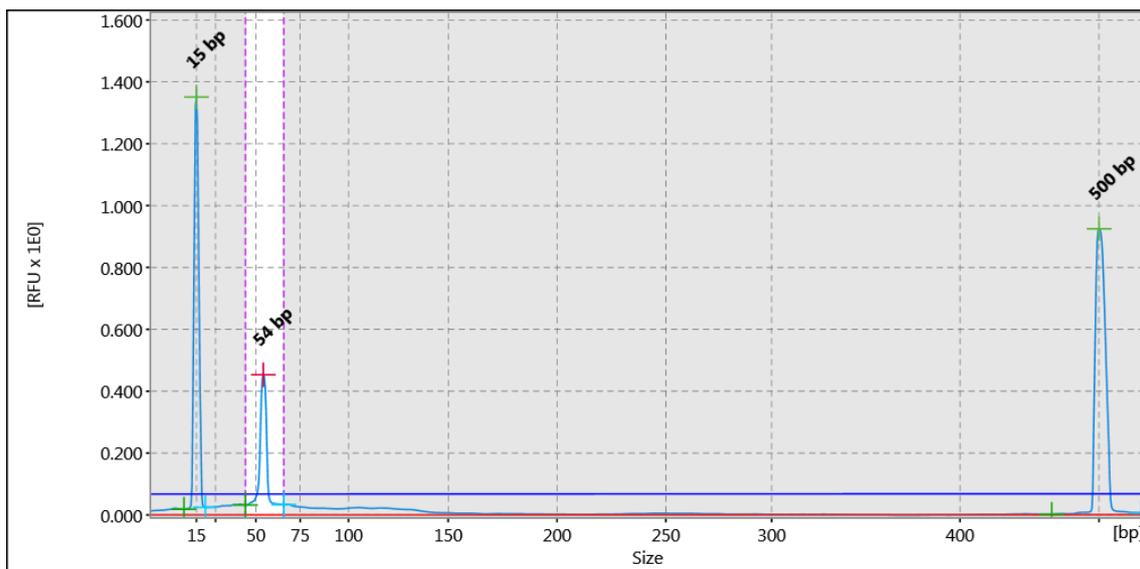


Figure: 37

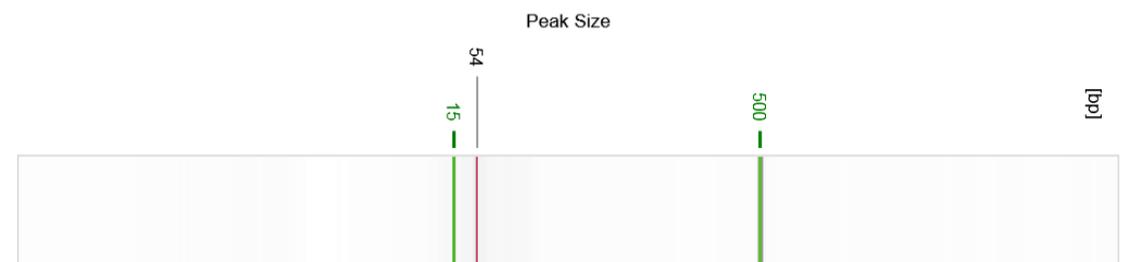


Figure:38

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

miR-122-5p Qiaxcel Condición 2

10⁷ copias

Sample Header			
Position:	A6	Plate ID:	C190804A02_2020-03-12_15-28-41, R: 1, E: 1
Run Date:	3/12/2020 3:28:41 PM		

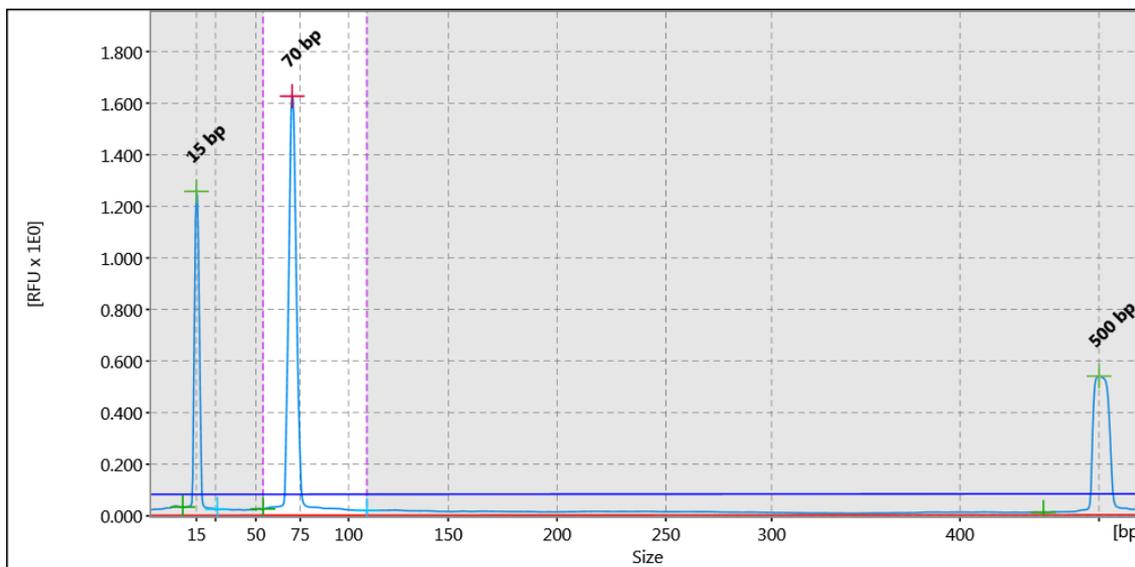


Figure: 13

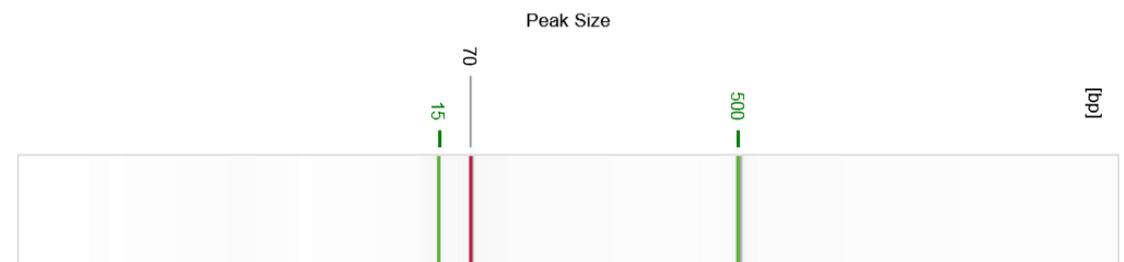


Figure:14

Result Table					
#	Size [bp]	Conc. [ng/μl]	#	Size	Conc. [ng/μl]
1	15	n/a	2	70	21.90
3	500	n/a	Total		21.90

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV

10⁵ copias

Sample Header			
Position:	A12	Plate ID:	C190804A02_2020-03-12_15-28-41, R: 1, E: 1
Run Date:	3/12/2020 3:28:41 PM		

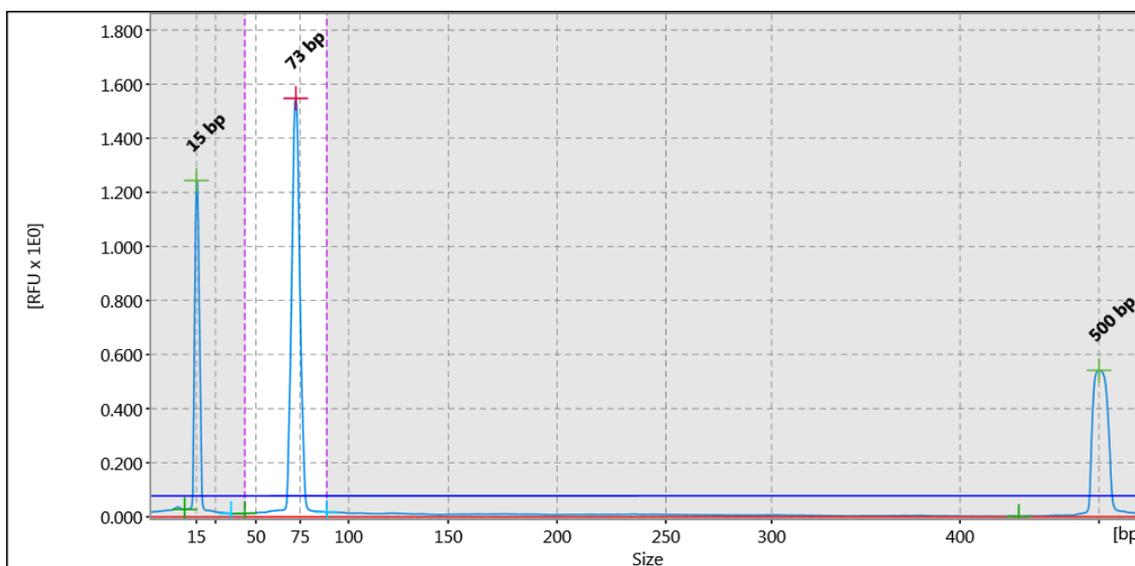


Figure: 25

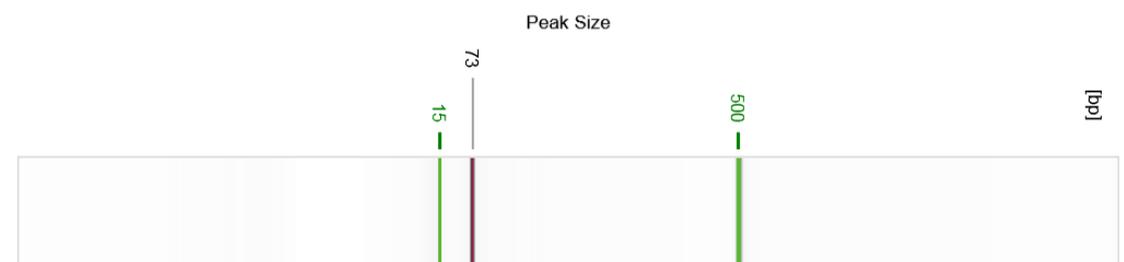


Figure:26

Result Table					
#	Size [bp]	Conc. [ng/μl]	#	Size	Conc. [ng/μl]
1	15	n/a	2	73	21.02
3	500	n/a	Total		21.02

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV

NTC

Sample Header			
Position:	B6	Plate ID:	C190804A02_2020-03-12_15-28-41, R: 1, E: 1
Run Date:	3/12/2020 3:28:41 PM		

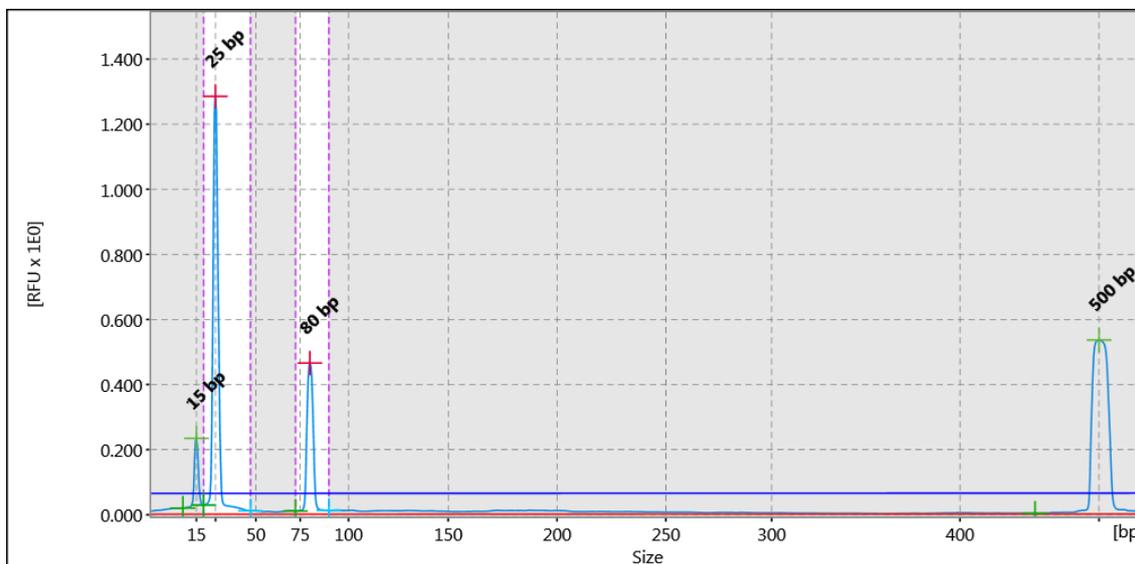


Figure: 37

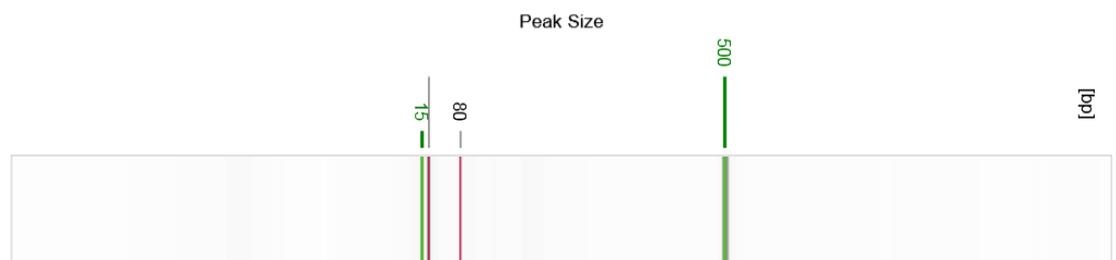


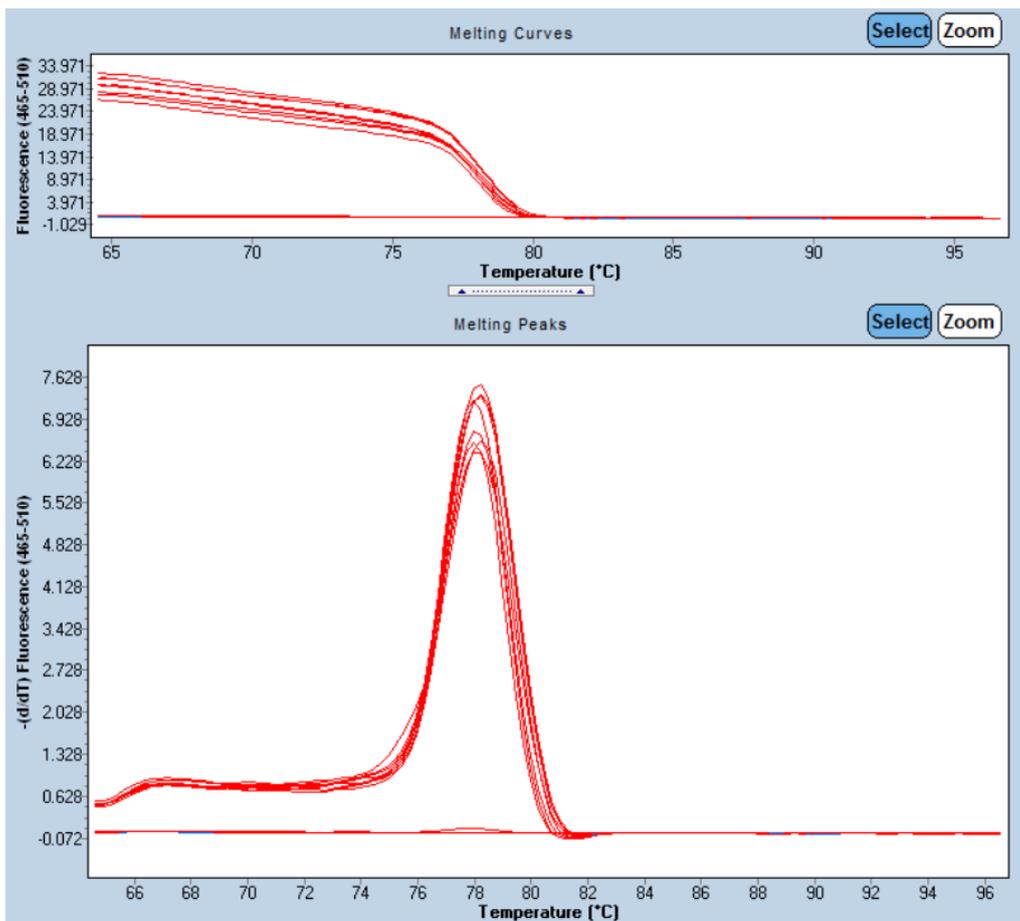
Figure: 38

Result Table					
#	Size [bp]	Conc. [ng/μl]	#	Size	Conc. [ng/μl]
1	15	n/a	2	25	9.85
3	80	4.69	4	500	n/a
Total		14.54			

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

miR-223-5p Curvas de *melting*

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1	Ct
10 ⁷ copias RT1	78.18	18.93	2.89	6.56	28.09
10 ⁷ copias RT1	78.23	22.32	2.88	7.74	28.01
10 ⁷ copias RT2	78.22	21.93	2.91	7.55	26.07
10 ⁷ copias RT2	78.26	22.08	2.92	7.57	26.03
10 ⁵ copias RT1	78.23	19.80	2.95	6.71	35.45
10 ⁵ copias RT1	78.04	19.43	2.61	7.45	37.26
10 ⁵ copias RT2	78.04	17.06	2.54	6.71	37.70
10 ⁵ copias RT2	78.11	18.57	2.69	6.91	36.66
NTC RT1					
NTC RT1					
NTC RT2	78.08	0.21	2.55	0.08	
NTC RT2	78.58	0.10	5.92	0.02	
BqPCR					
BqPCR					



miR-223-5p Qiaxcel Condición 1

10⁷ copias

Sample Header			
Position:	F2	Plate ID:	C190804A02_2020-02-05_14-15-47, R: 1, E: 1
Run Date:	2/5/2020 2:15:47 PM		

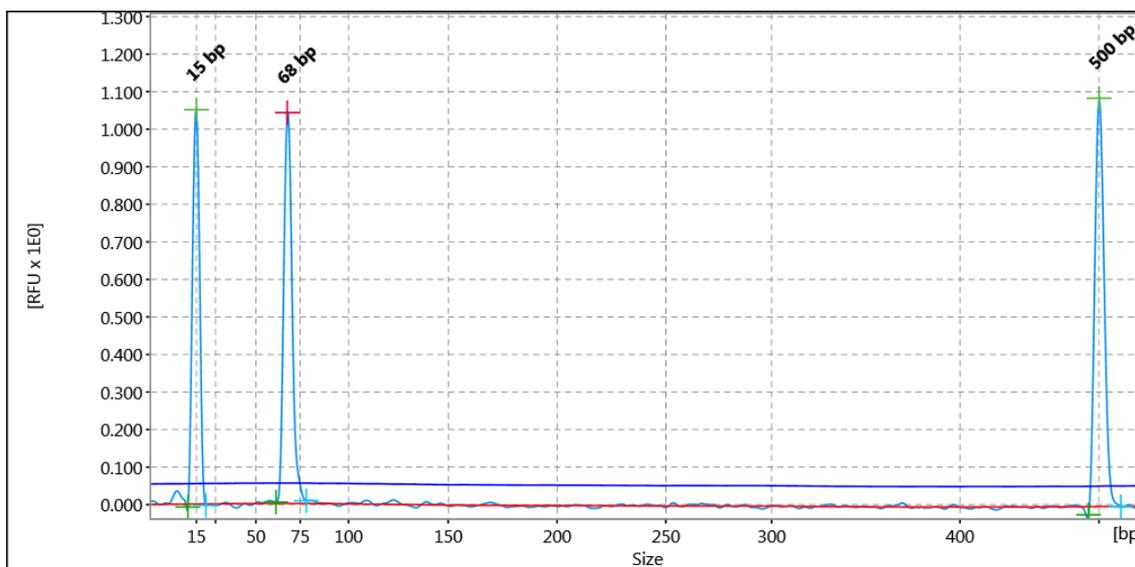


Figure: 5

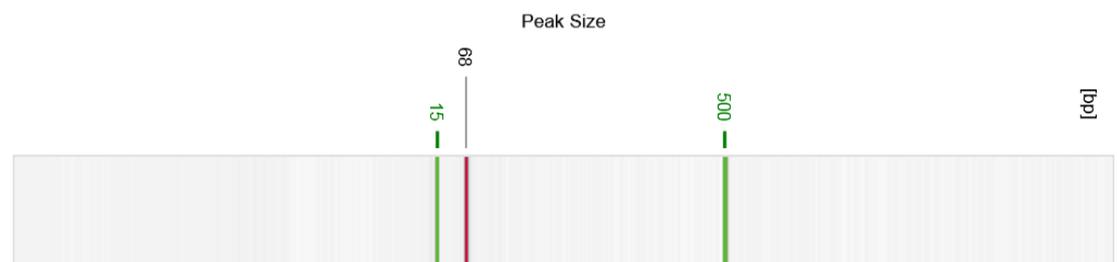


Figure: 6

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

10⁵ copias

Sample Header			
Position:	G2	Plate ID:	C190804A02_2020-02-05_14-15-47, R: 1, E: 1
Run Date:	2/5/2020 2:15:48 PM		

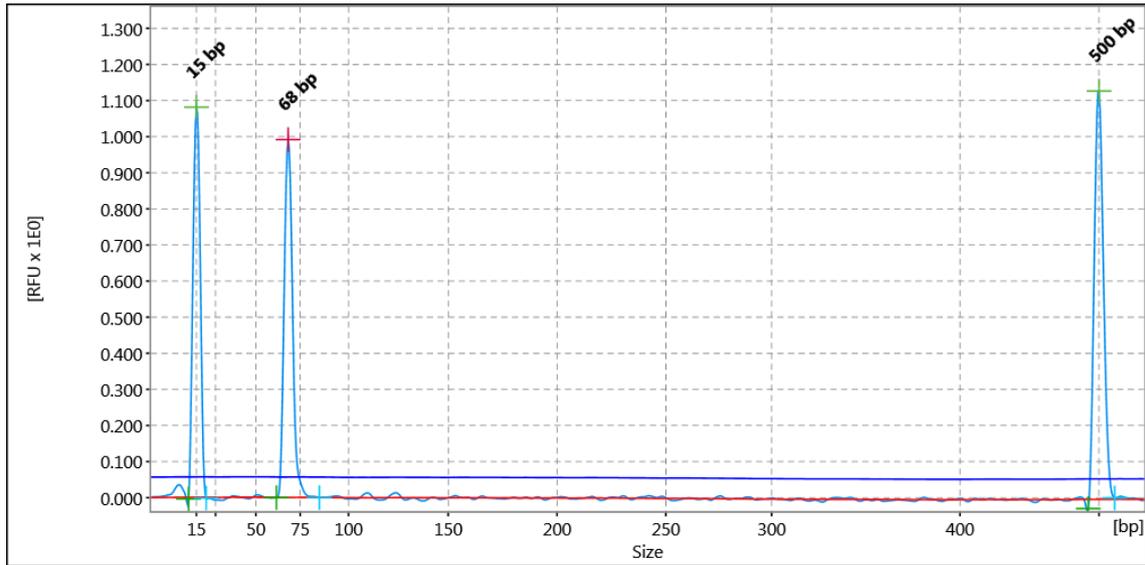


Figure: 17

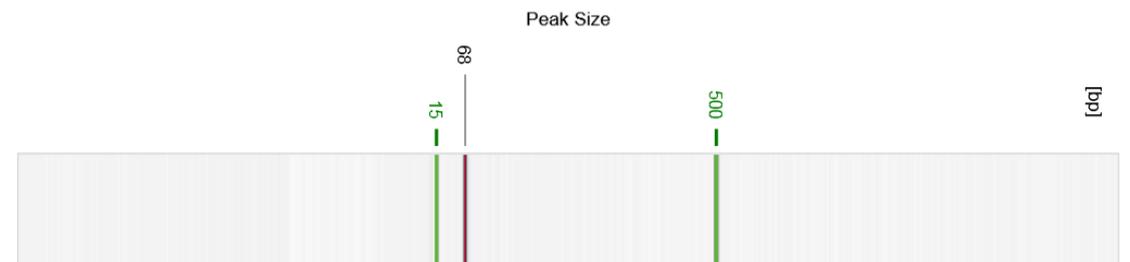


Figure: 18

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

NTC

Sample Header			
Position:	G8	Plate ID:	C190804A02_2020-02-05_14-15-47, R: 1, E: 1
Run Date:	2/5/2020 2:15:48 PM		

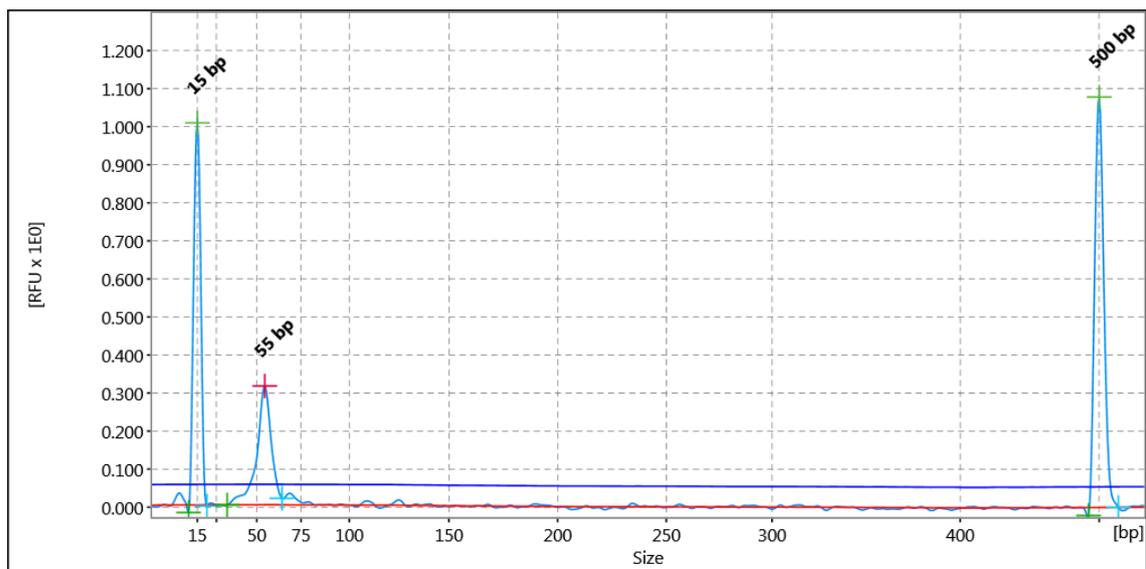


Figure:29

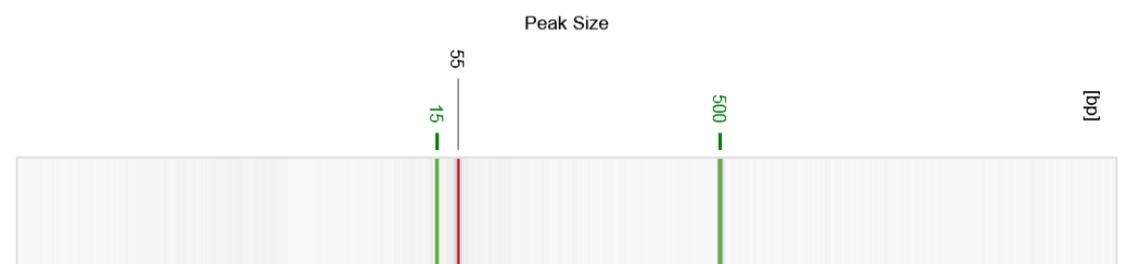


Figure: 30

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

miR-223-5p Qiaxcel Condición 2

10⁷ copias

Sample Header			
Position:	F3	Plate ID:	C190804A02_2020-02-05_14-15-47, R: 1, E: 1
Run Date:	2/5/2020 2:15:47 PM		

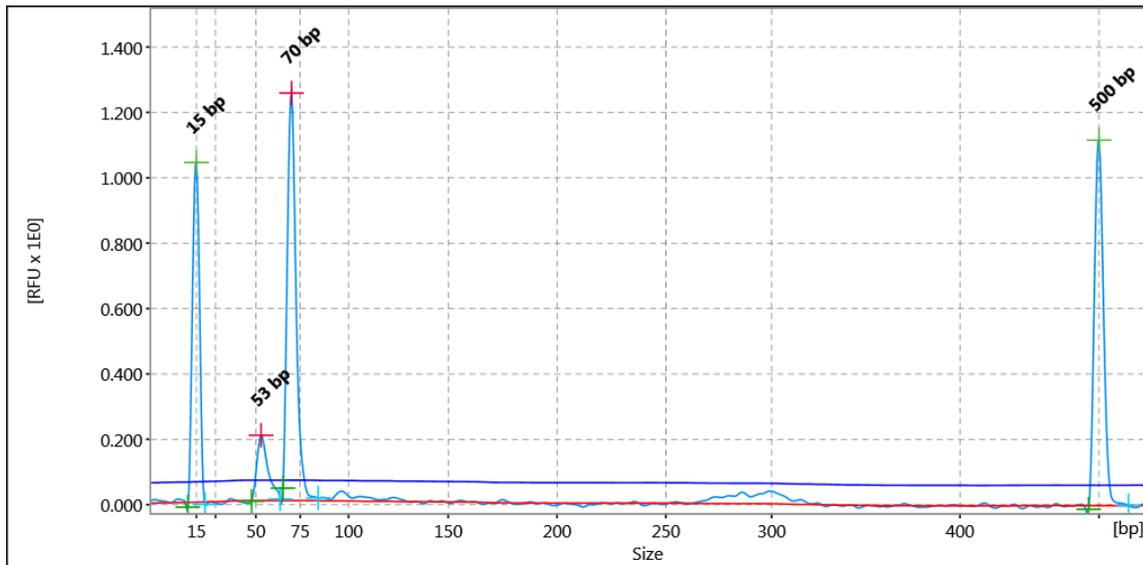


Figure: 7

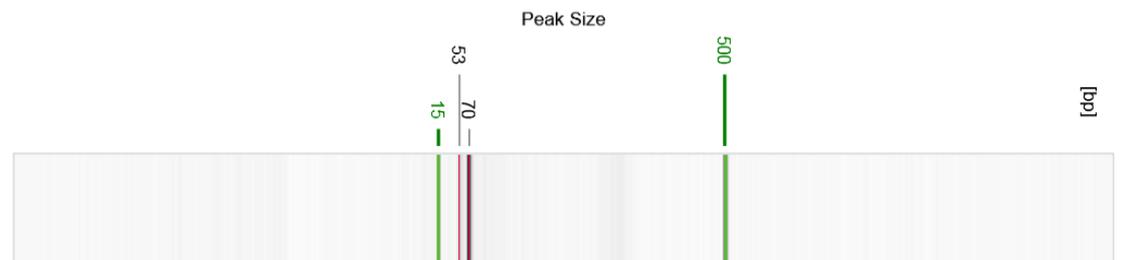


Figure: 8

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

10⁵ copias

Sample Header			
Position:	G3	Plate ID:	C190804A02_2020-02-05_14-15-47, R: 1, E: 1
Run Date:	2/5/2020 2:15:48 PM		

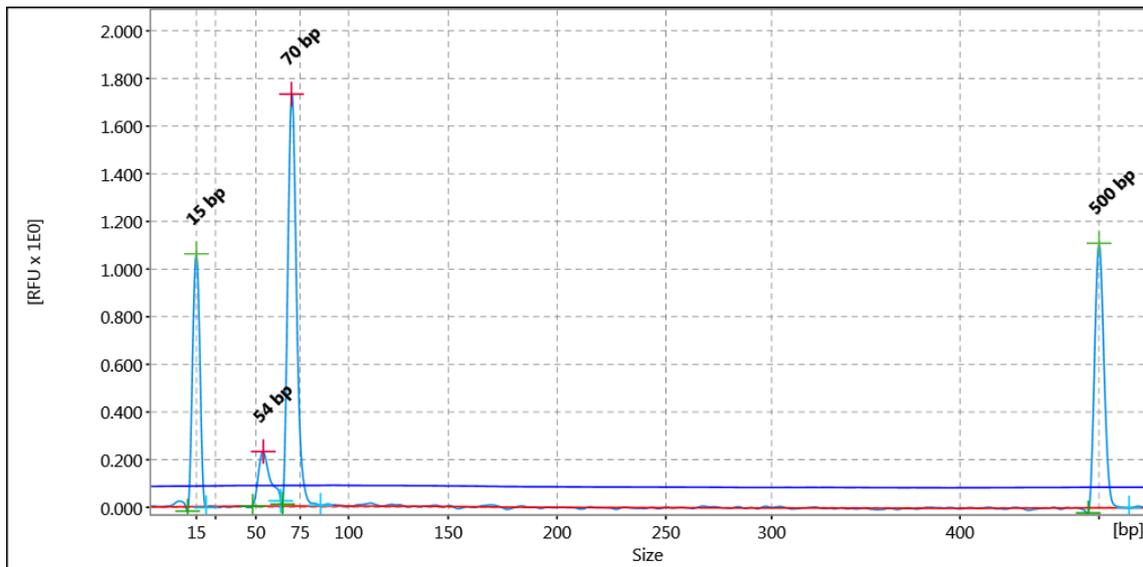


Figure: 19

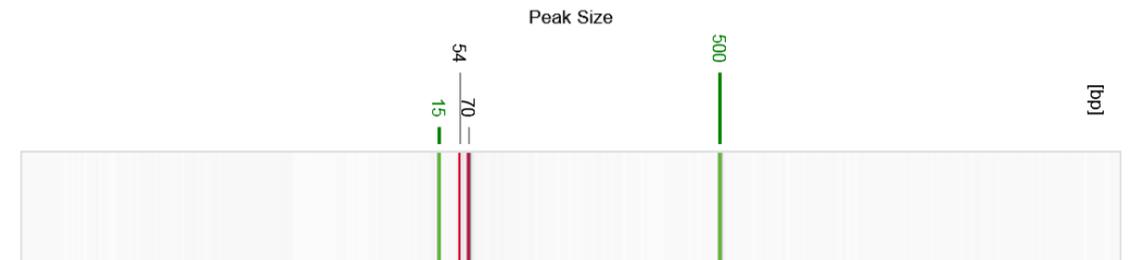


Figure: 20

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

NTC

Sample Header			
Position:	G10	Plate ID:	C190804A02_2020-02-05_14-15-47, R: 1, E: 1
Run Date:	2/5/2020 2:15:48 PM		

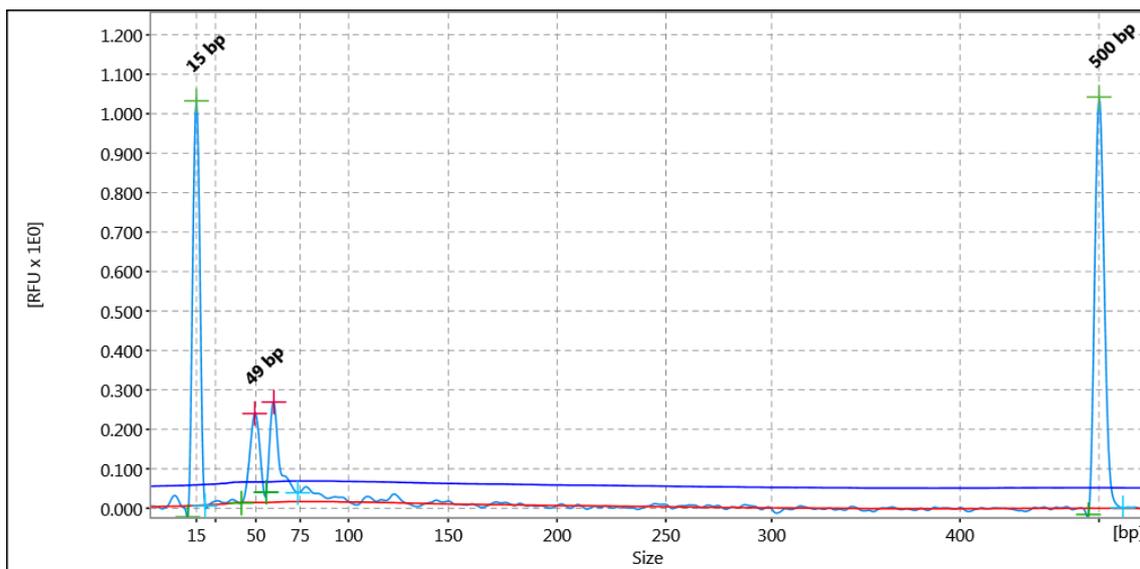


Figure: 33

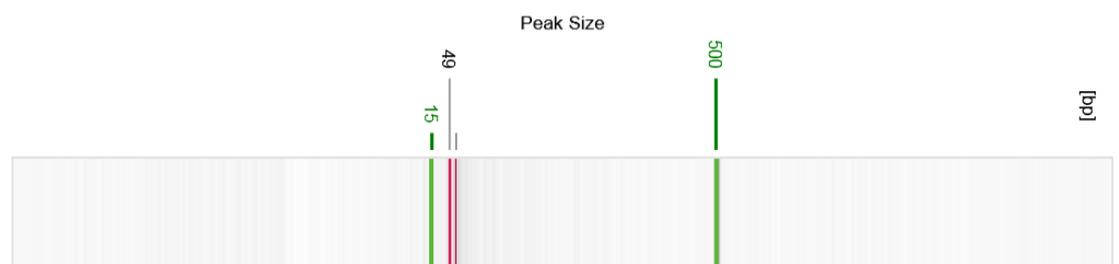
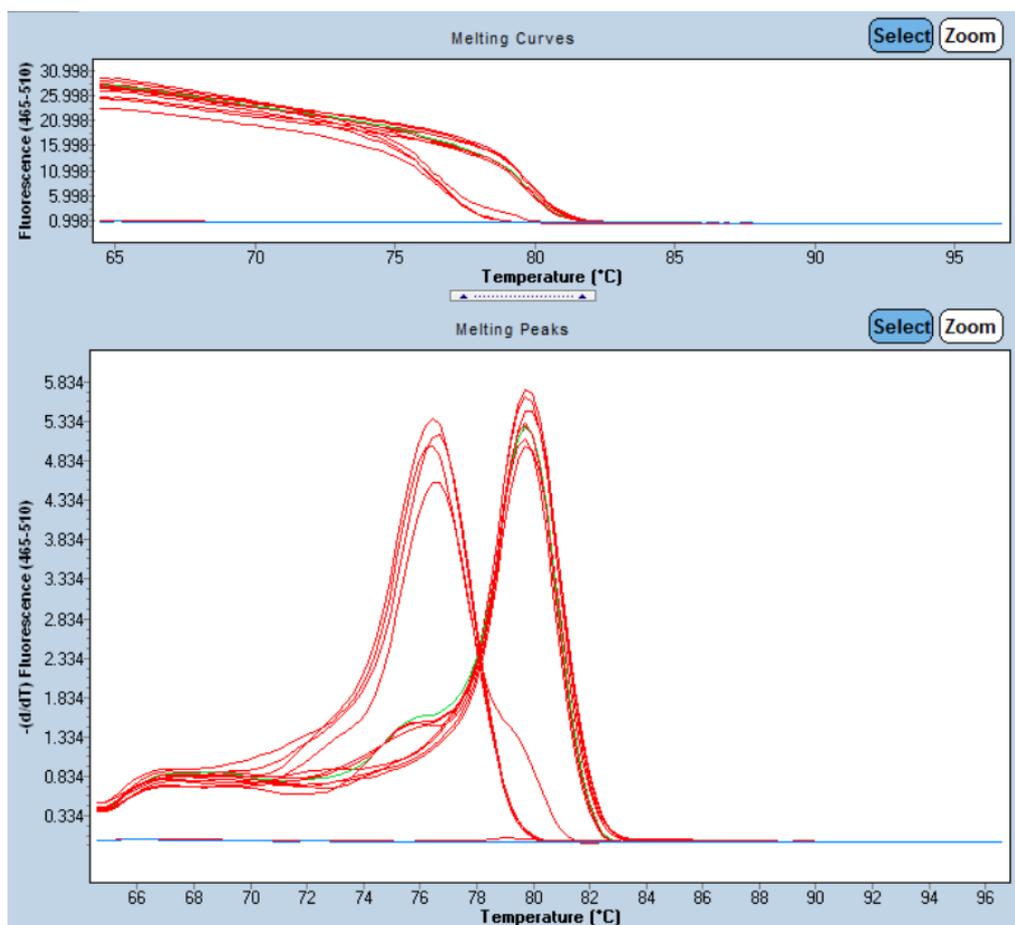


Figure: 34

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV

miR-1306-3p Curvas *melting*. 25 nM de cebador de RT

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1	Ct
10 ⁷ copias RT1	79.85	16.90	2.96	5.70	22.90
10 ⁷ copias RT1	79.86	15.04	2.97	5.06	22.47
10 ⁷ copias RT2	79.93	16.50	2.98	5.53	21.86
10 ⁷ copias RT2	79.85	17.45	3.01	5.79	21.98
10 ⁵ copias RT1	79.86	14.02	2.62	5.36	29.67
10 ⁵ copias RT1	79.85/76.69	14.06/3.42	2.62/3.16	5.36/1.08	29.74
10 ⁵ copias RT2	79.82	14.07	2.60	5.40	29.49
10 ⁵ copias RT2	79.74	13.99	2.68	5.22	29.82
NTC RT1	76.63	20.16	4.24	4.75	34.76
NTC RT1	76.46	19.10	3.53	5.42	34.93
NTC RT2	76.62	15.84	3.43	4.62	35.06
NTC RT2	76.62	17.90	3.45	5.20	34.81
BqPCR					
BqPCR					



miR-1306-3p Qiaxcel. Cebador de RT 25nM. Condición 1

10⁷ copias

Sample Header			
Position:	A4	Plate ID:	C190804A02_2020-03-12_15-28-41, R: 1, E: 1
Run Date:	3/12/2020 3:28:41 PM		

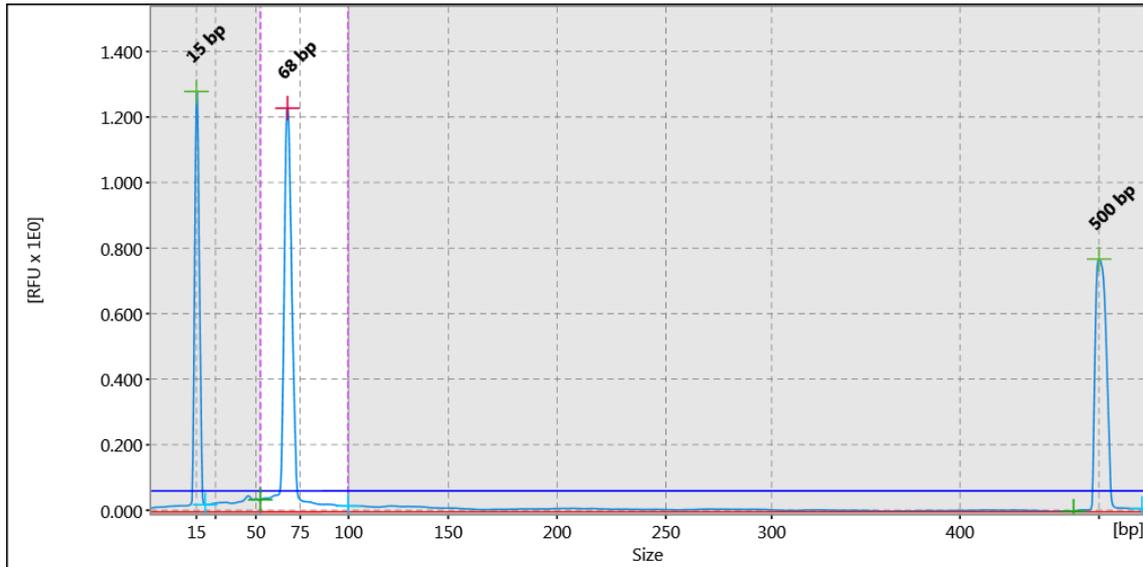


Figure:9

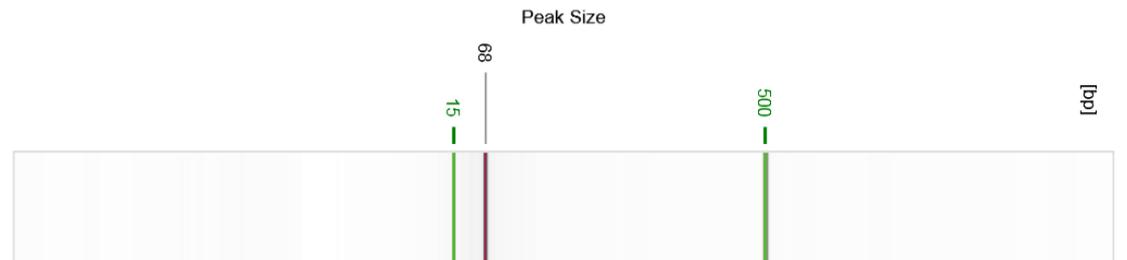
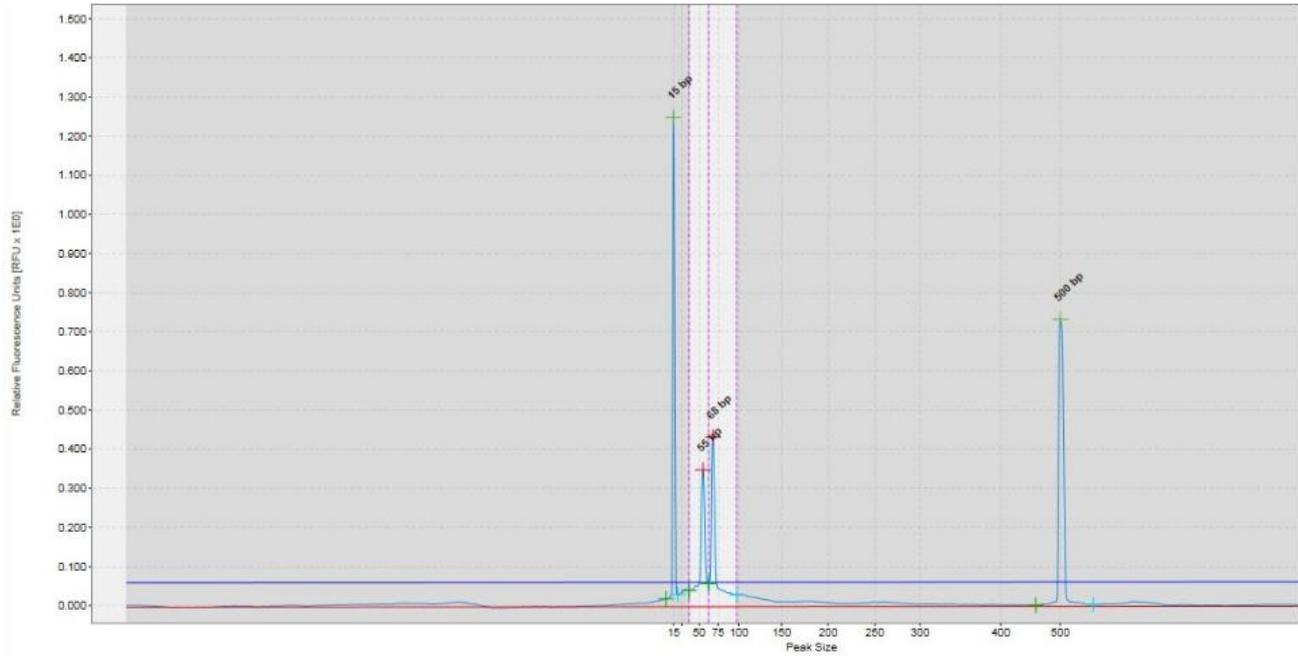


Figure: 10

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

10⁵ copias

Sample Header			
Position:	A10	Plate ID:	C190804A02_2020-03-12_15-28-41, R: 1, E: 1
Run Date:	3/12/2020 3:28:41 PM		



Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

NTC

Sample Header			
Position:	B4	Plate ID:	C190804A02_2020-03-12_15-28-41, R: 1, E: 1
Run Date:	3/12/2020 3:28:41 PM		

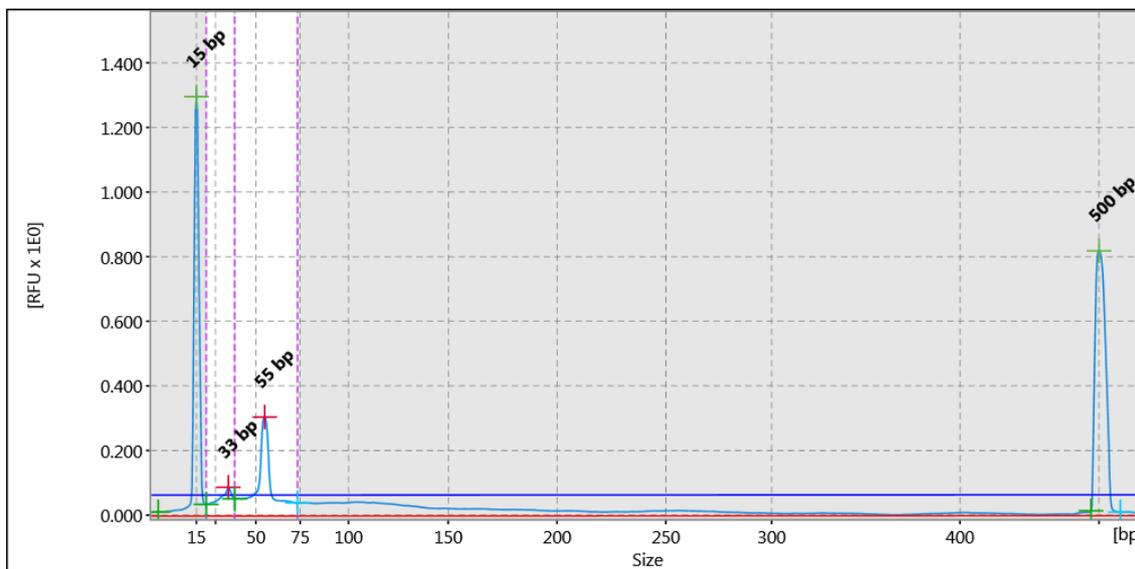


Figure: 33

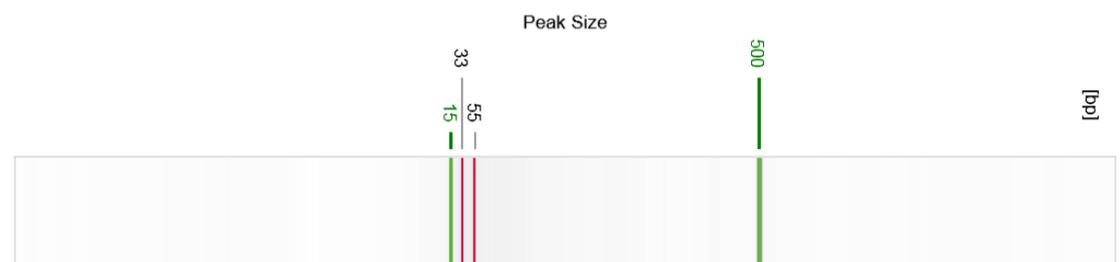


Figure: 34

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV

miR-1306-3p Qiaxcel. Cebador de RT 25nM. Condición 2

10⁷ copias

Sample Header			
Position:	A5	Plate ID:	C190804A02_2020-03-12_15-28-41, R: 1, E: 1
Run Date:	3/12/2020 3:28:41 PM		

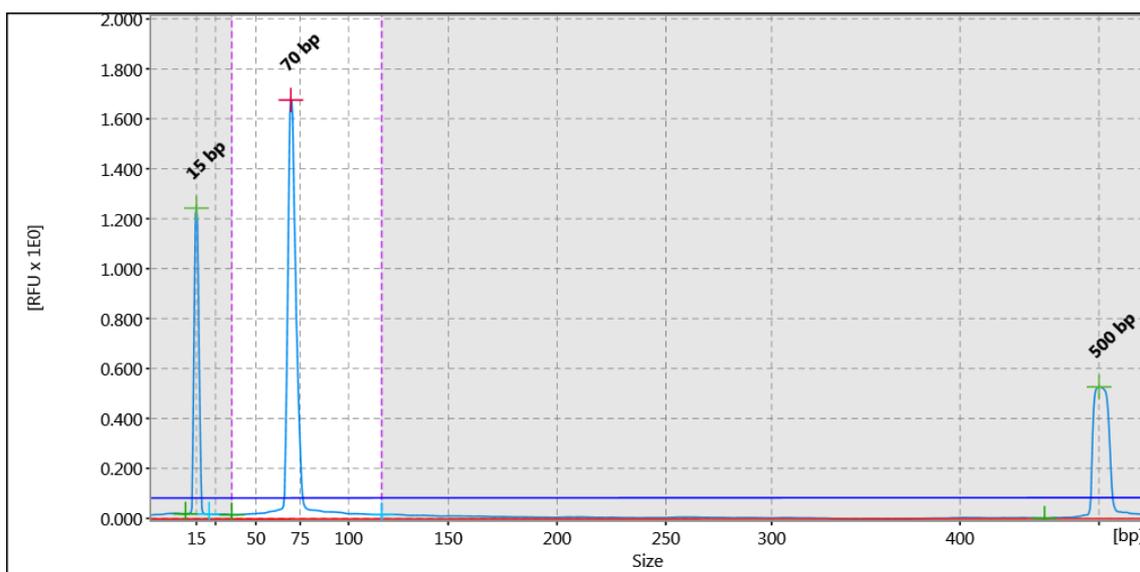


Figure: 9

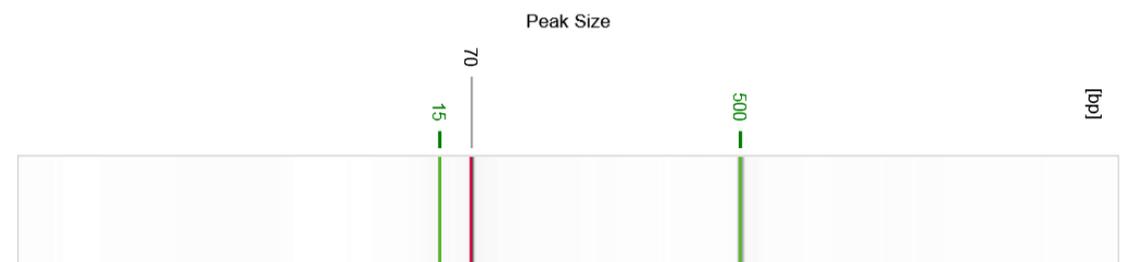


Figure: 10

Result Table					
#	Size [bp]	Conc. [ng/μl]	#	Size	Conc. [ng/μl]
1	15	n/a	2	70	24.72
3	500	n/a	Total		24.72

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

10⁵ copias

Sample Header			
Position:	A11	Plate ID:	C190804A02_2020-03-12_15-28-41, R: 1, E: 1
Run Date:	3/12/2020 3:28:41 PM		

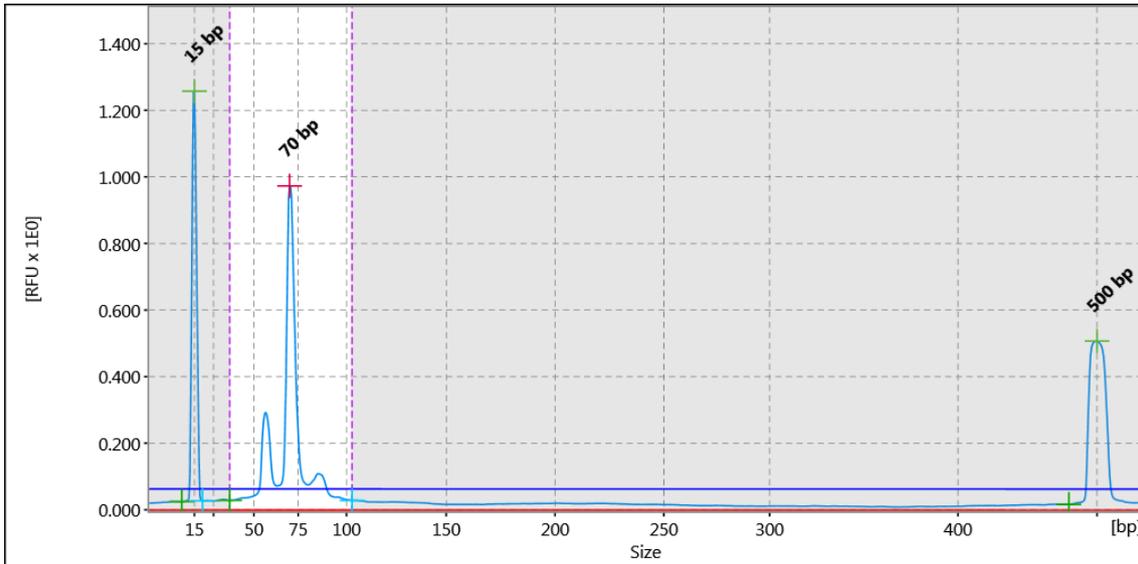


Figure: 21

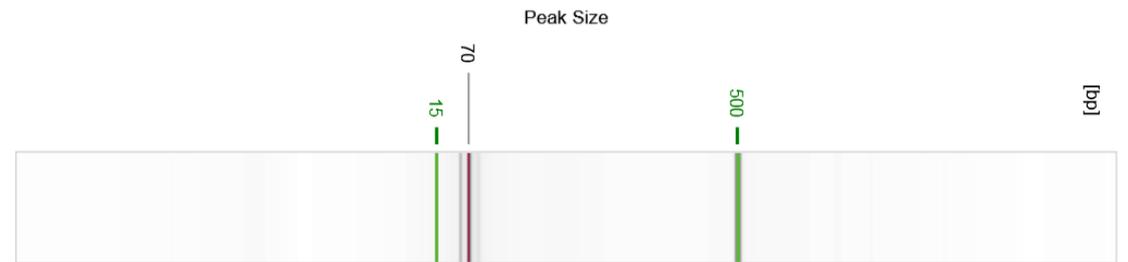


Figure: 22

Result Table					
#	Size [bp]	Conc. [ng/μl]	#	Size	Conc. [ng/μl]
1	15	n/a	2	70	22.14
3	500	n/a	Total		22.14

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

NTC

Sample Header			
Position:	B5	Plate ID:	C190804A02_2020-03-12 15-28-41, R: 1, E:
Run Date:	3/12/2020 3:28:41 PM		

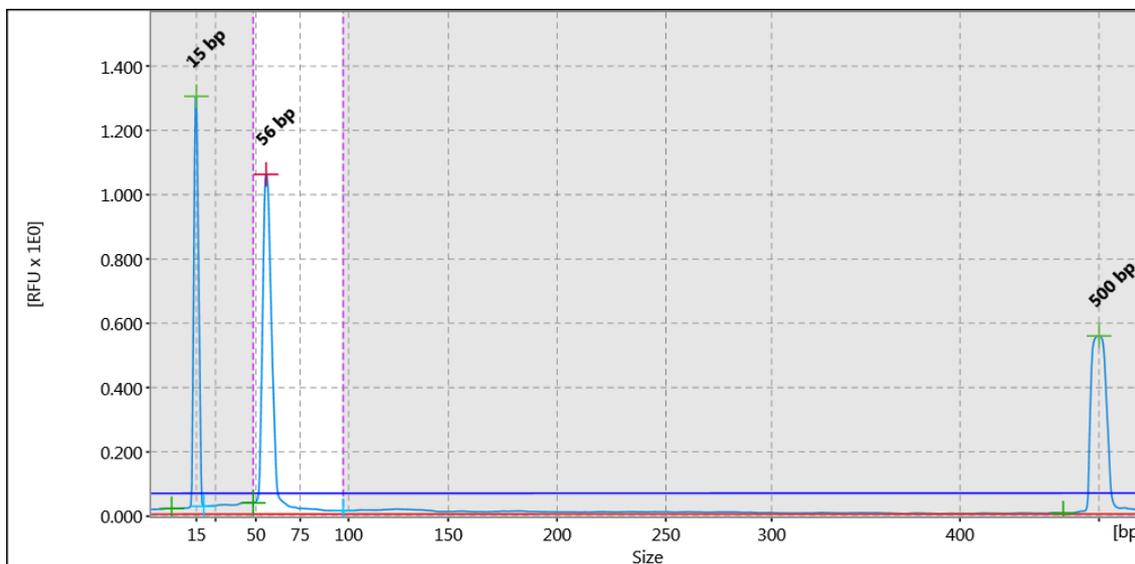


Figure: 33

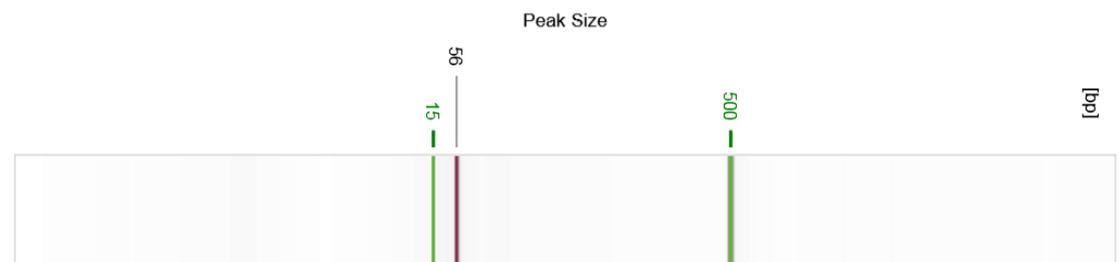


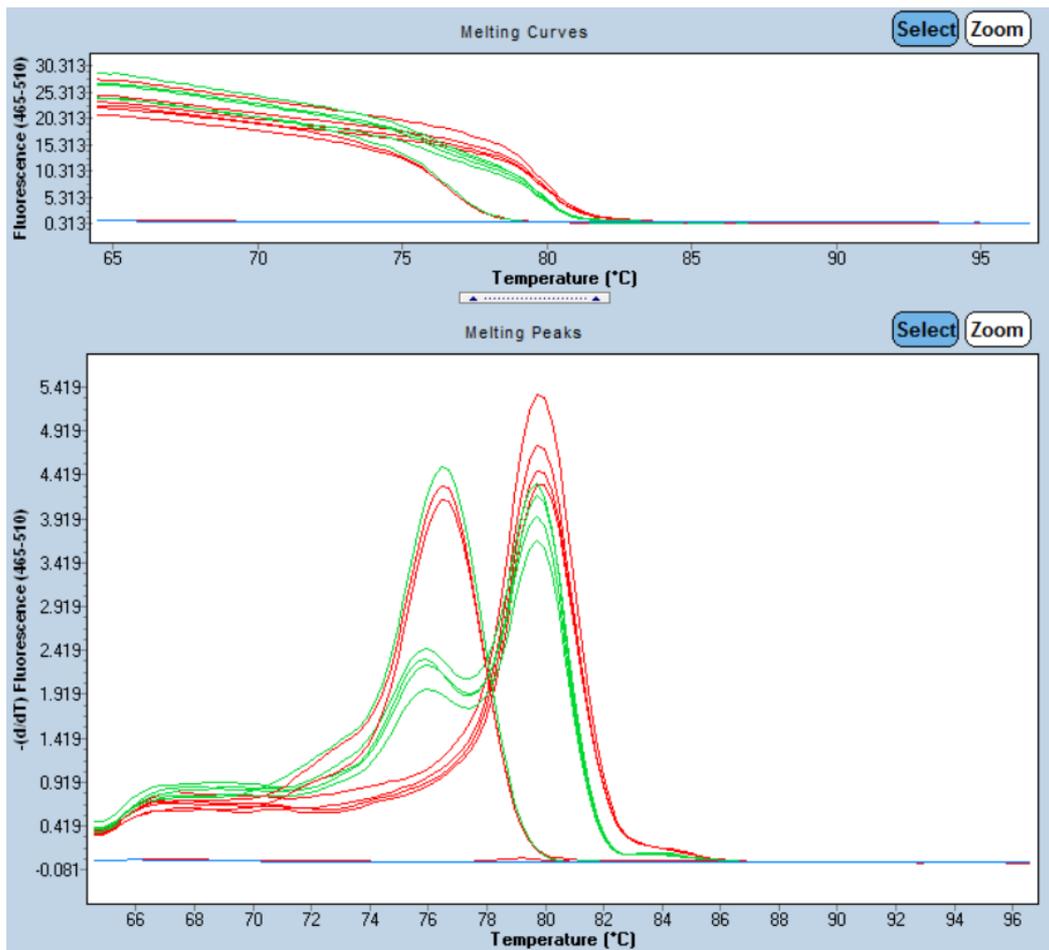
Figure: 34

Result Table					
#	Size [bp]	Conc. [ng/μl]	#	Size	Conc. [ng/μl]
1	15	n/a	2	56	15.68
3	500	n/a	Total		15.68

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

miR-1306-3p Curvas de *melting*. 50nM cebador de RT

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1	Ct
10 ⁷ copias RT1	79.92	16.64	3.11	5.35	22.49
10 ⁷ copias RT1	79.95	13.49	3.14	4.30	22.50
10 ⁷ copias RT2	79.93	14.00	3.14	4.46	22.82
10 ⁷ copias RT2	79.91	14.84	3.13	4.74	22.50
10 ⁵ copias RT1	79.84/76.32	9.62/5.30	2.60/3.61	3.70/1.47	28.76
10 ⁵ copias RT1	79.84/76.22	11.14/5.77	2.64/3.41	4.22/1.69	28.93
10 ⁵ copias RT2	79.78/76.17	11.49/6.43	2.63/3.52	4.36/1.83	28.71
10 ⁵ copias RT2	79.80/76.12	10.72/5.76	2.69/3.31	3.98/1.74	28.41
NTC RT1	76.56	15.10	3.52	4.29	35.55
NTC RT1	76.65	12.93	3.06	4.23	34.90
NTC RT2	76.65/73.54	14.13/3.63	3.06/3.43	4.62/1.06	34.82
NTC RT2	76.70	12.03	3.16	5.71	35.48
BqPCR					
BqPCR					



miR-1306-3p Qiaxcel. Cebador de RT 50nM. Condición 1

10⁷ copias

Sample Header			
Position:	A3	Plate ID:	C190804A02_2020-03-10_14-19-52, R: 1, E: 1
Run Date:	3/10/2020 2:19:52 PM		

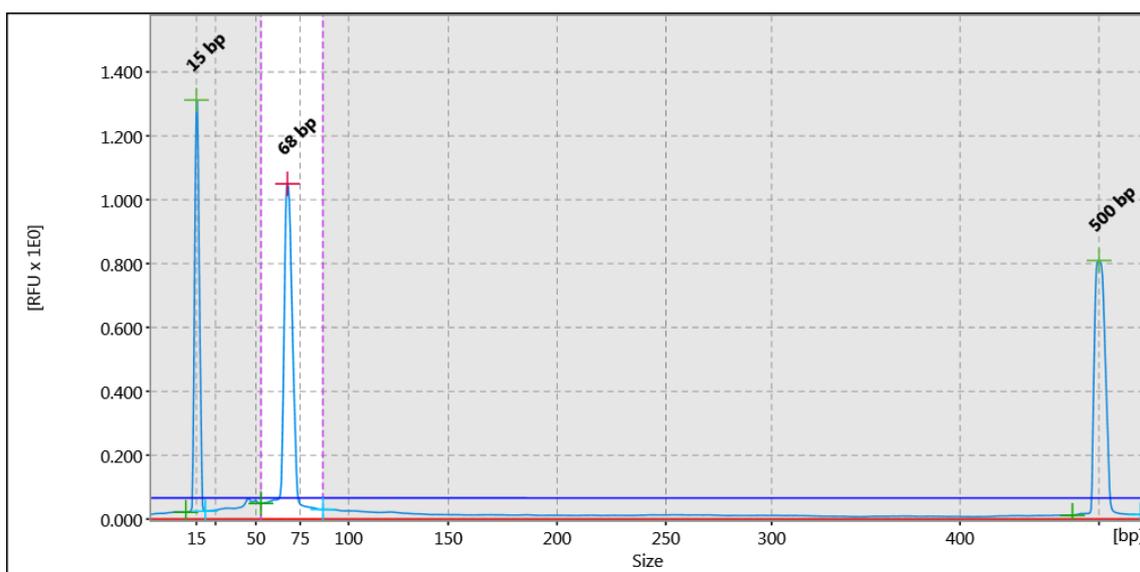


Figure: 7

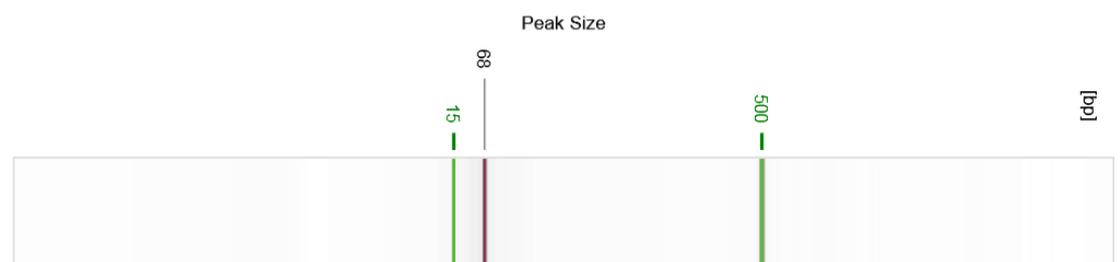


Figure: 8

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

10⁵ copias

Sample Header			
Position:	A9	Plate ID:	C190804A02_2020-03-10_14-19-52, R: 1, E: 1
Run Date:	3/10/2020 2:19:52 PM		

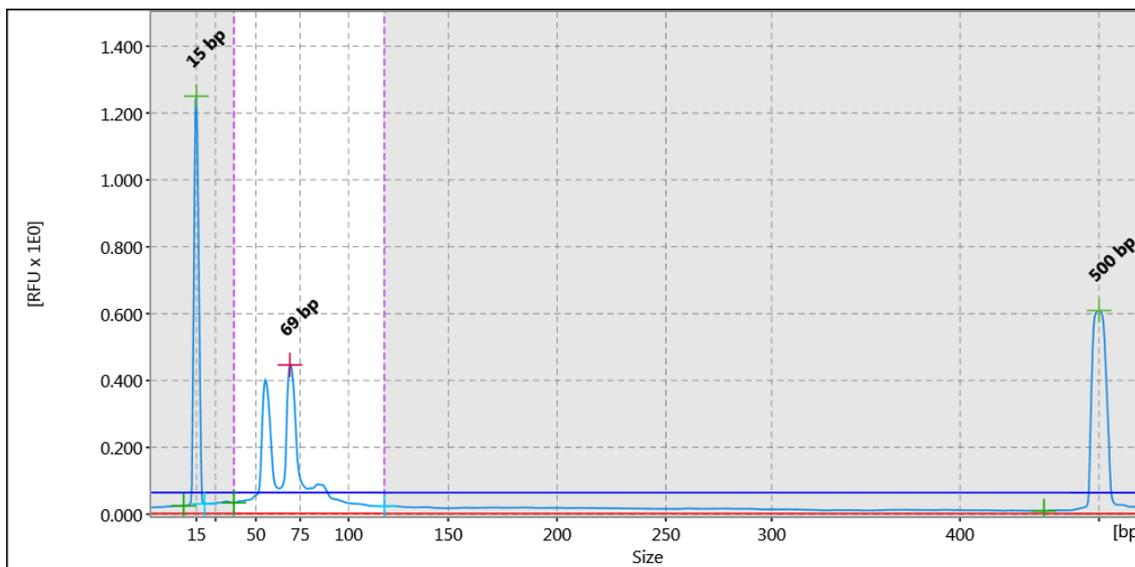


Figure: 19

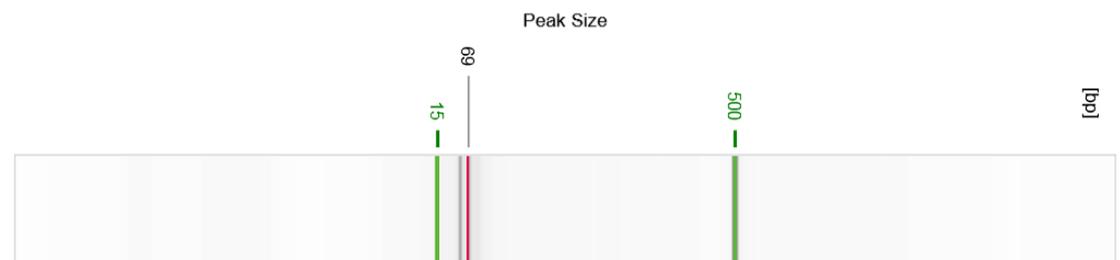


Figure: 20

Result Table					
#	Size [bp]	Conc. [ng/μl]	#	Size	Conc. [ng/μl]
1	15	n/a	2	69	17.96
3	500	n/a	Total		17.96

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV

NTC

Sample Header			
Position:	B3	Plate ID:	C190804A02_2020-03-10_14-19-52, R: 1, E: 1
Run Date:	3/10/2020 2:19:52 PM		

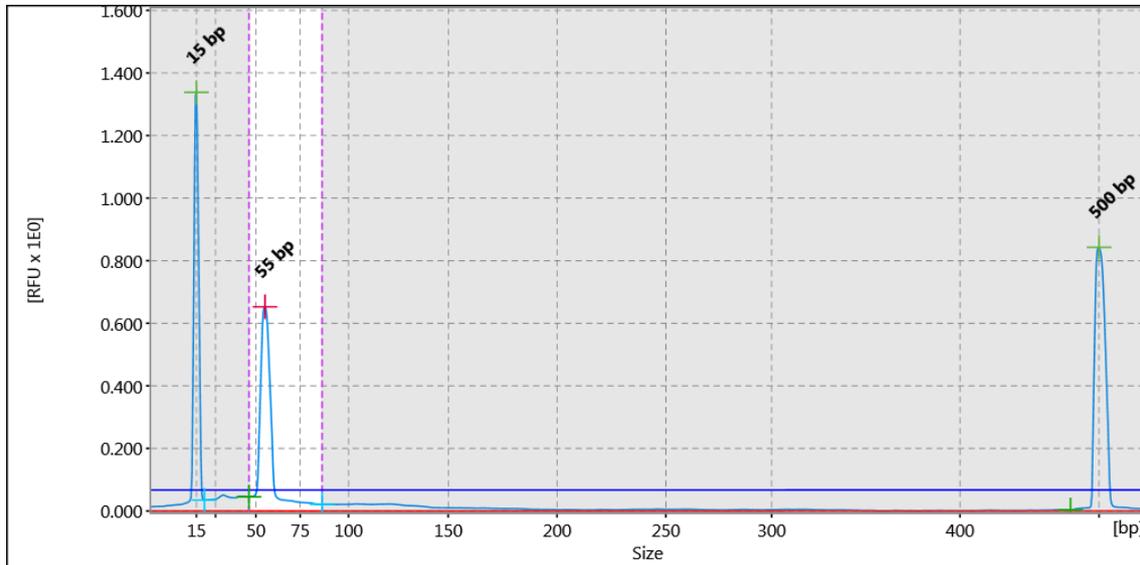


Figure: 31

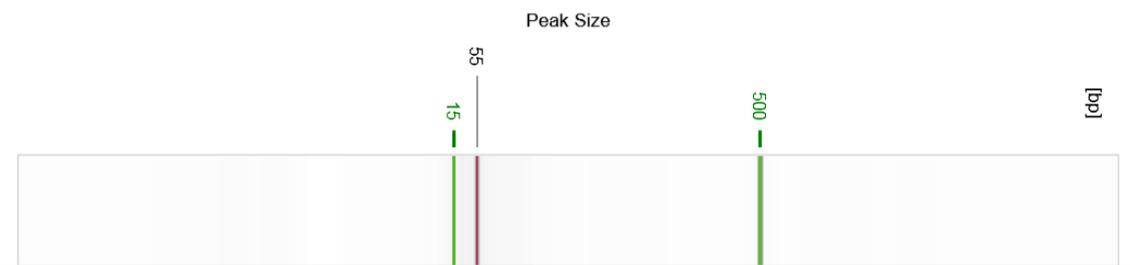


Figure: 32

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV

miR-1306-3p Qiaxcel. Cebador de RT 50nM. Condición 2.

10⁷ copias

Sample Header			
Position:	F6	Plate ID:	C190804A02_2020-03-10_14-19-52, R: 1, E: 1
Run Date:	3/10/2020 2:19:52 PM		

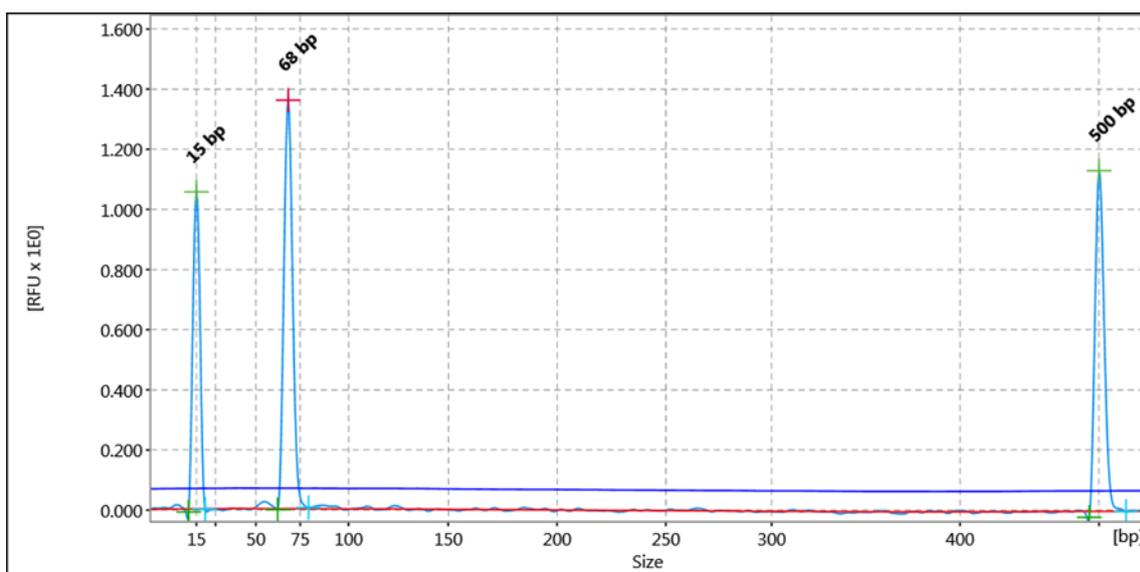


Figure: 13

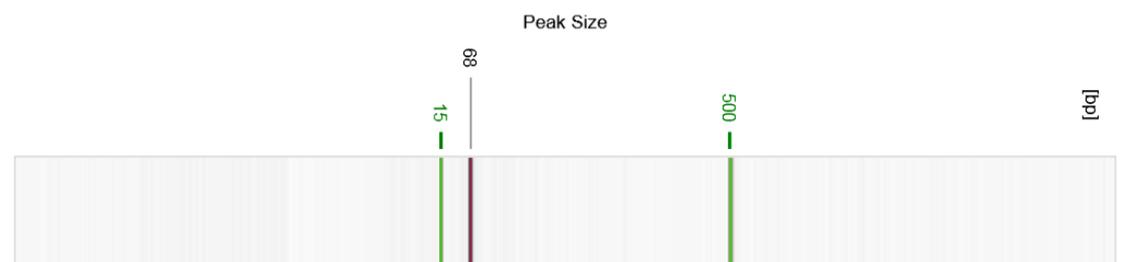


Figure: 14

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV

10⁵ copias

Sample Header			
Position:	G6	Plate ID:	C190804A02_2020-03-10_14-19-52, R: 1, E: 1
Run Date:	3/10/2020 2:19:52 PM		

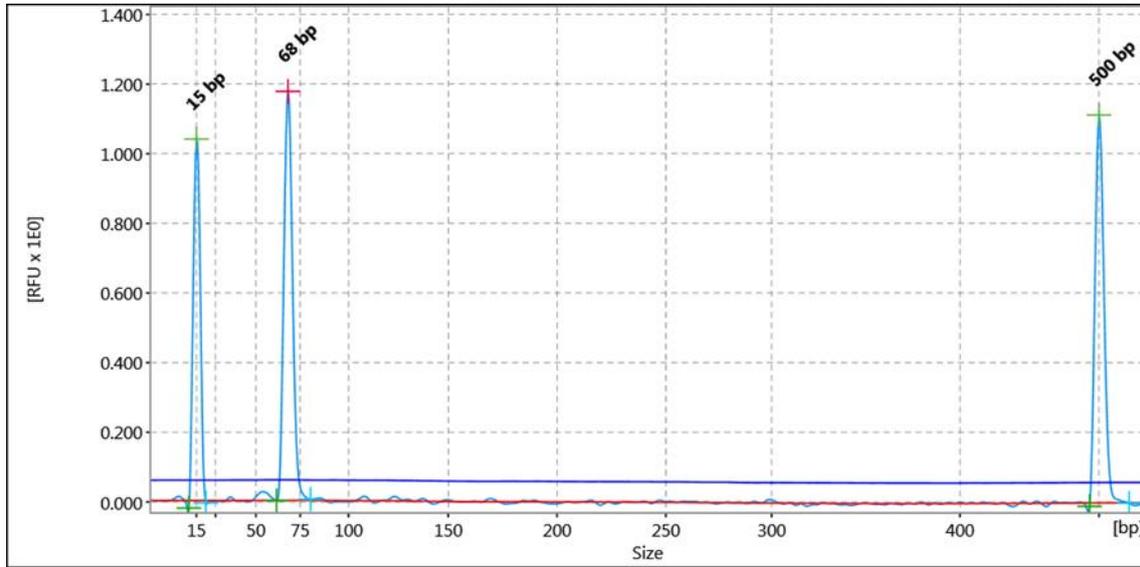


Figure: 25

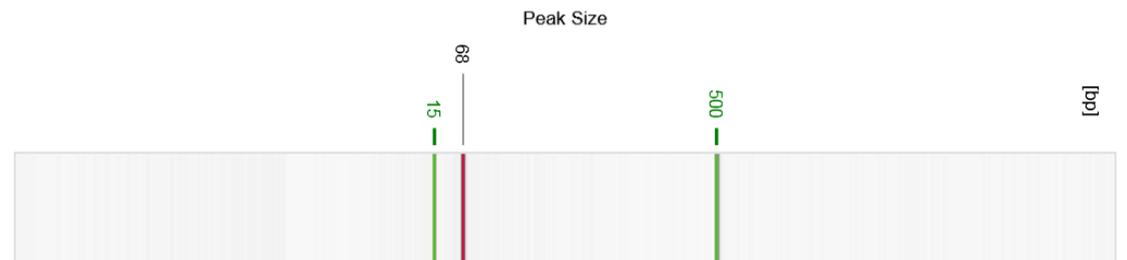


Figure: 26

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

NTC

Sample Header			
Position:	B4	Plate ID:	C190804A02_2020-03-10_14-19-52, R: 1, E: 1
Run Date:	3/10/2020 2:19:52 PM		

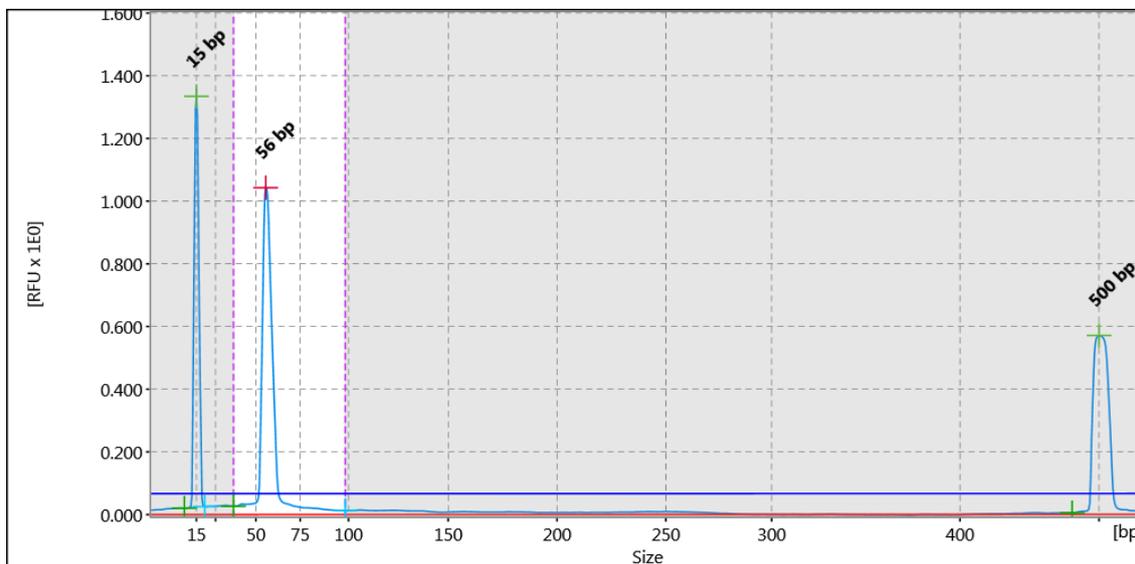


Figure: 31

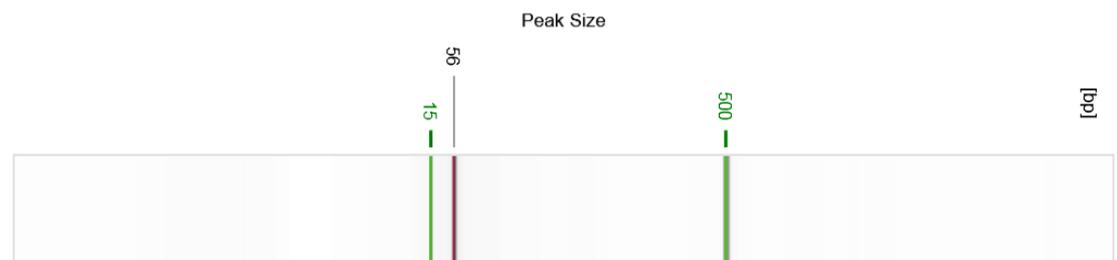


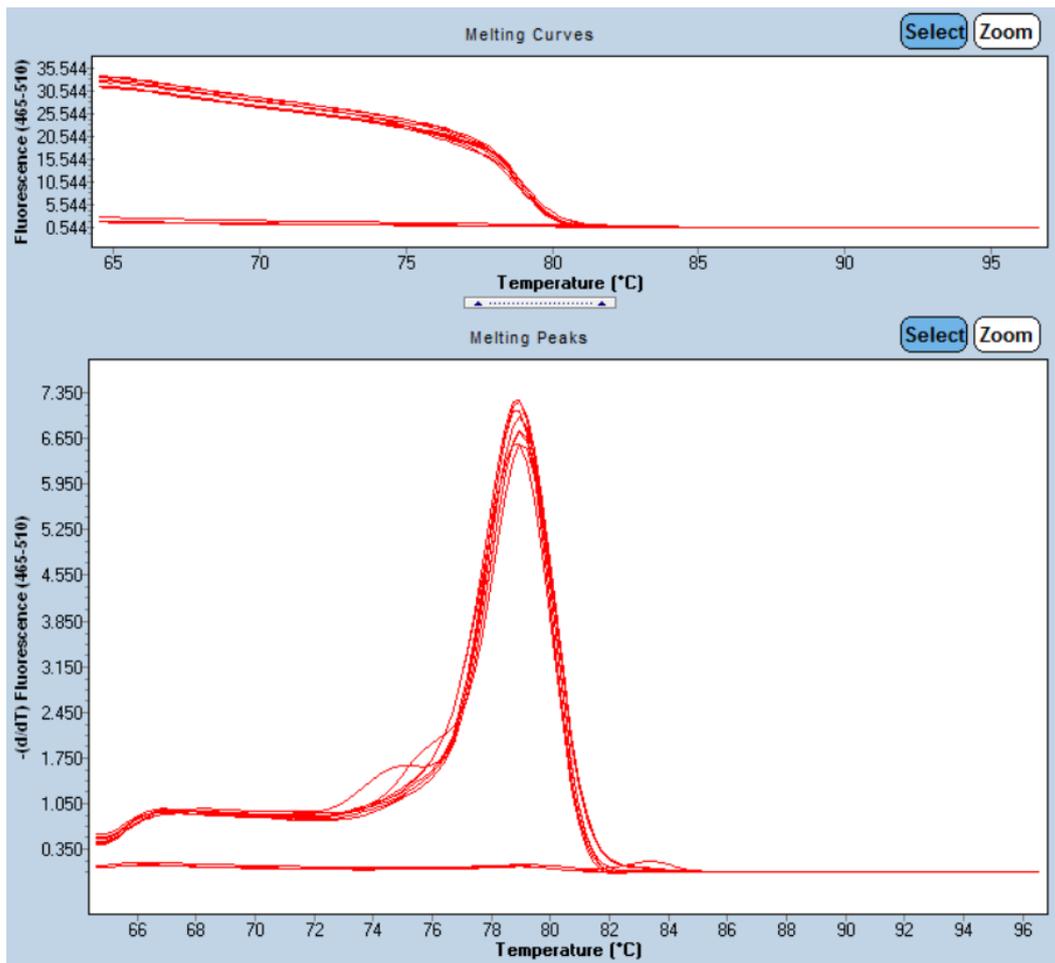
Figure: 32

Result Table					
#	Size [bp]	Conc. [ng/μl]	#	Size	Conc. [ng/μl]
1	15	n/a	2	56	17.24
3	500	n/a	Total		17.24

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV

miR-191-5p Curvas de melting

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1	Ct
10 ⁷ copias RT1	79.92	16.64	3.11	5.35	22.49
10 ⁷ copias RT1	79.95	13.49	3.14	4.30	22.50
10 ⁷ copias RT2	79.93	14.00	3.14	4.46	22.82
10 ⁷ copias RT2	79.91	14.84	3.13	4.74	22.50
10 ⁵ copias RT1	79.84/76.32	9.62/5.30	2.60/3.61	3.70/1.47	28.76
10 ⁵ copias RT1	79.84/76.22	11.14/5.77	2.64/3.41	4.22/1.69	28.93
10 ⁵ copias RT2	79.78/76.17	11.49/6.43	2.63/3.52	4.36/1.83	28.71
10 ⁵ copias RT2	79.80/76.12	10.72/5.76	2.69/3.31	3.98/1.74	28.41
NTC RT1	76.56	15.10	3.52	4.29	35.55
NTC RT1	76.65	12.93	3.06	4.23	34.90
NTC RT2	76.65/73.54	14.13/3.63	3.06/3.43	4.62/1.06	34.82
NTC RT2	76.70	12.03	3.16	5.71	35.48
BqPCR					
BqPCR					



miR-191-5p Qiaxcel Condición 1

10⁷ copias

Sample Header			
Position:	A1	Plate ID:	C190804A02_2020-03-10_14-19-52, R: 1, E: 1
Run Date:	3/10/2020 2:19:52 PM		

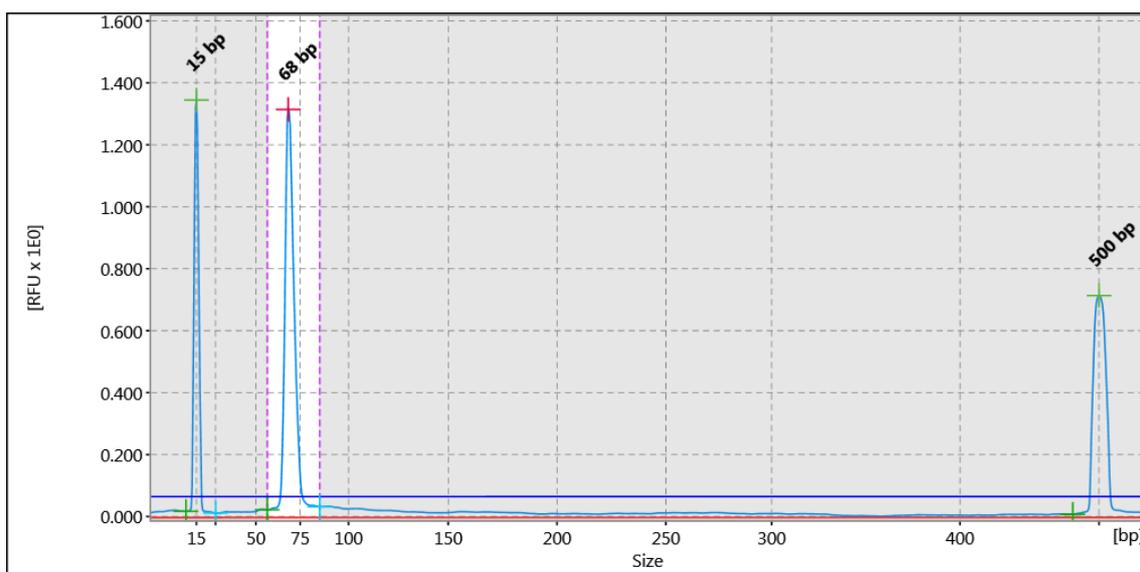


Figure: 3



Figure: 4

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV

10⁵ copias

Sample Header			
Position:	A7	Plate ID:	C190804A02_2020-03-10_14-19-52, R: 1, E: 1
Run Date:	3/10/2020 2:19:52 PM		

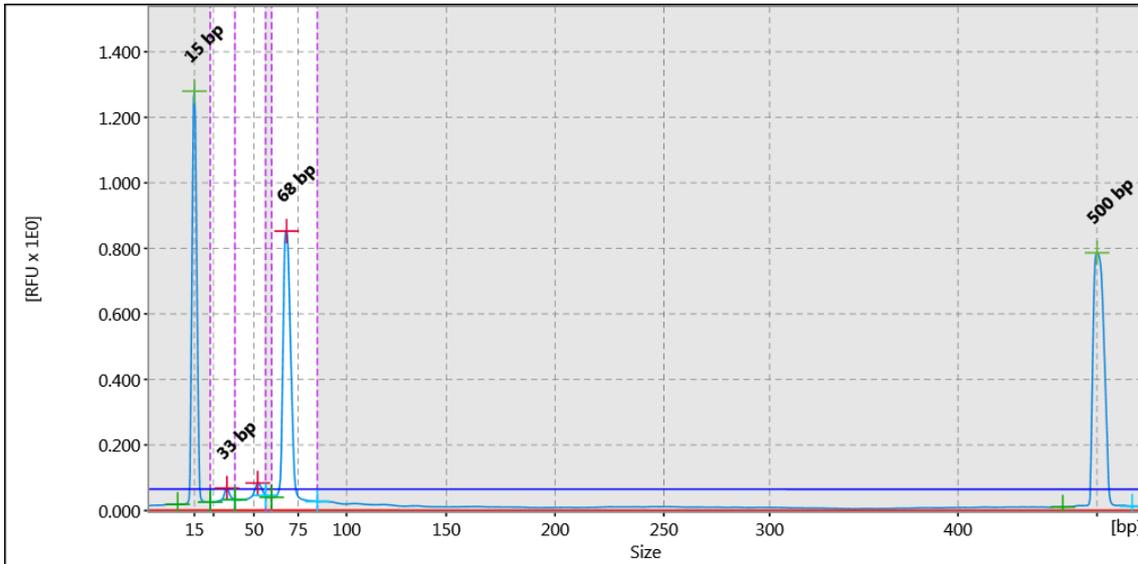


Figure: 15

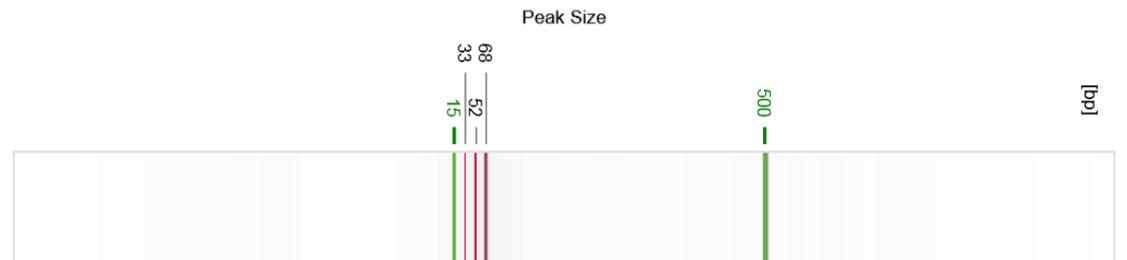


Figure: 16

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

NTC

Sample Header			
Position:	B1	Plate ID:	C190804A02_2020-03-10_14-19-52, R: 1, E: 1
Run Date:	3/10/2020 2:19:52 PM		

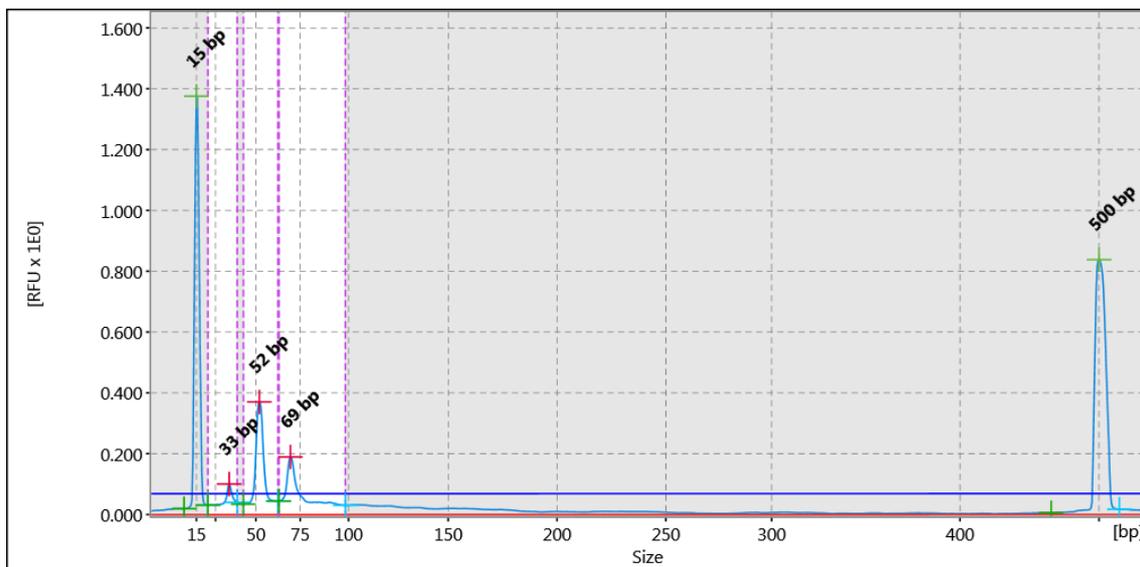


Figure: 27

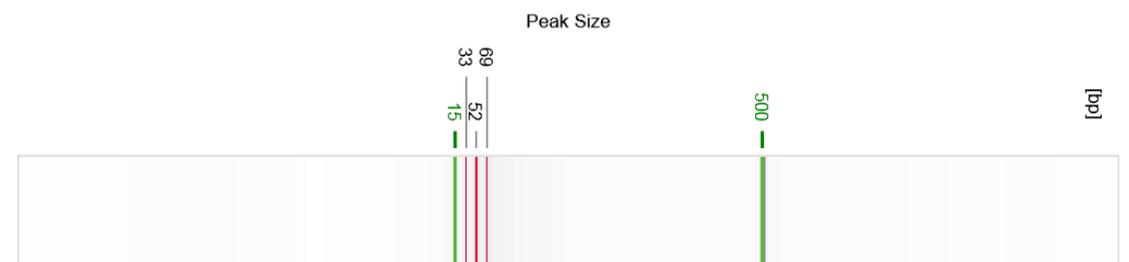


Figure: 28

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

miR-191-5p Qiaxcel Condición 2

10⁷ copias

Sample Header			
Position:	A1	Plate ID:	C190804A02_2020-03-12_15-28-41, R: 1, E:
Run Date:	3/12/2020 3:28:41 PM		

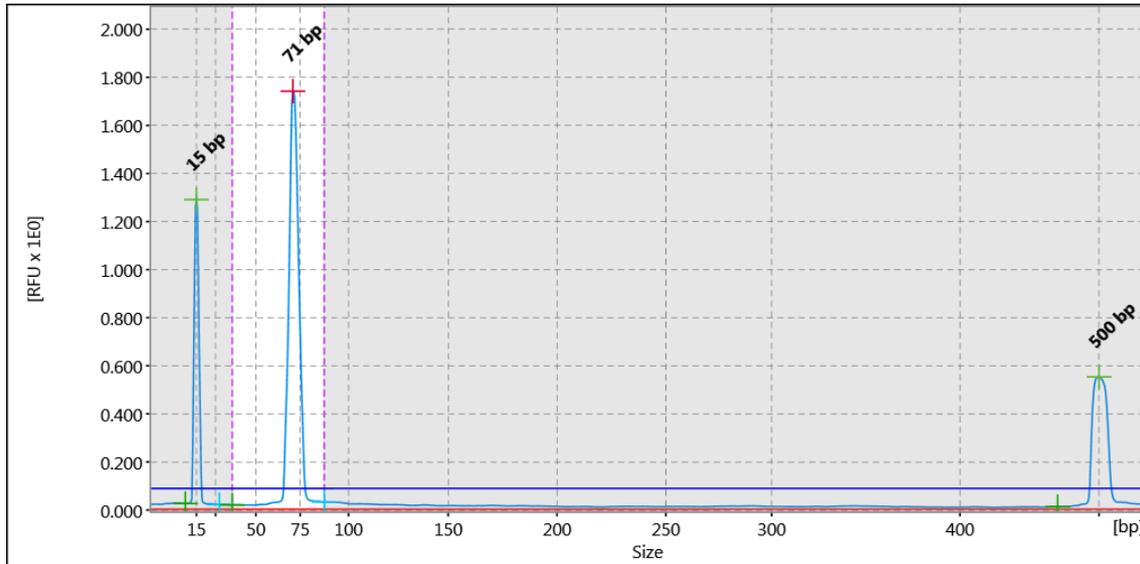


Figure: 3

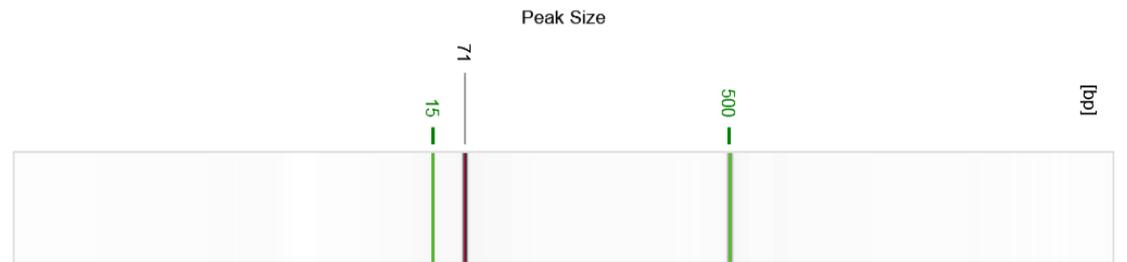


Figure: 4

Result Table					
#	Size [bp]	Conc. [ng/μl]	#	Size	Conc. [ng/μl]
1	15	n/a	2	71	28.22
3	500	n/a	Total		28.22

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

10⁵ copias

Sample Header			
Position:	A7	Plate ID:	C190804A02_2020-03-12_15-28-41, R: 1, E:
Run Date:	3/12/2020 3:28:41 PM		

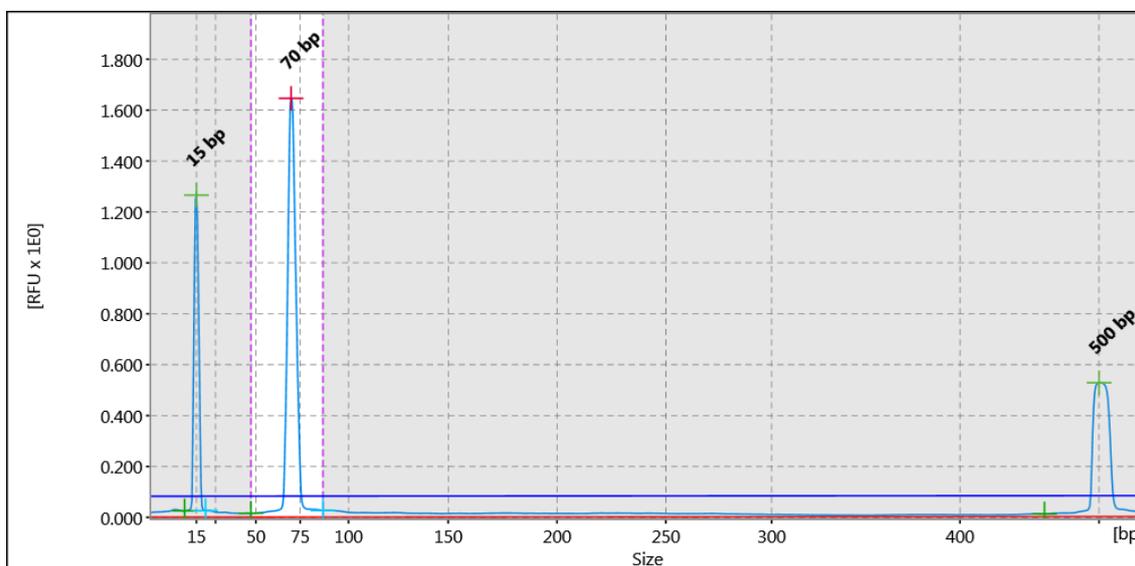


Figure: 15

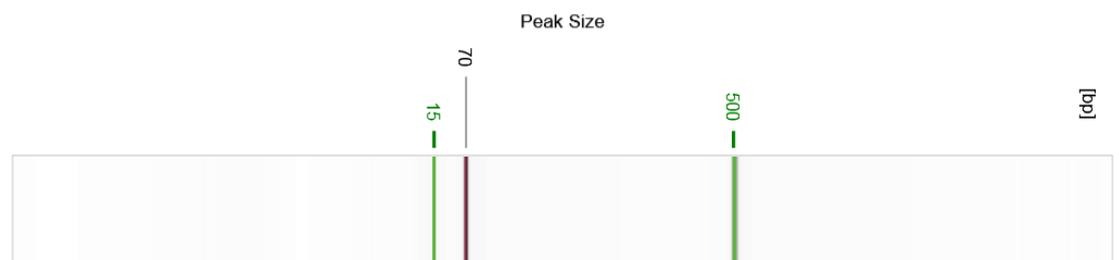


Figure: 16

Result Table					
#	Size [bp]	Conc. [ng/μl]	#	Size	Conc. [ng/μl]
1	15	n/a	2	70	22.20
3	500	n/a	Total		22.20

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

NTC

Sample Header			
Position:	G12	Plate ID:	C190804A02_2020-03-12_15-28-41, R: 1, E:
Run Date:	3/12/2020 3:28:41 PM		

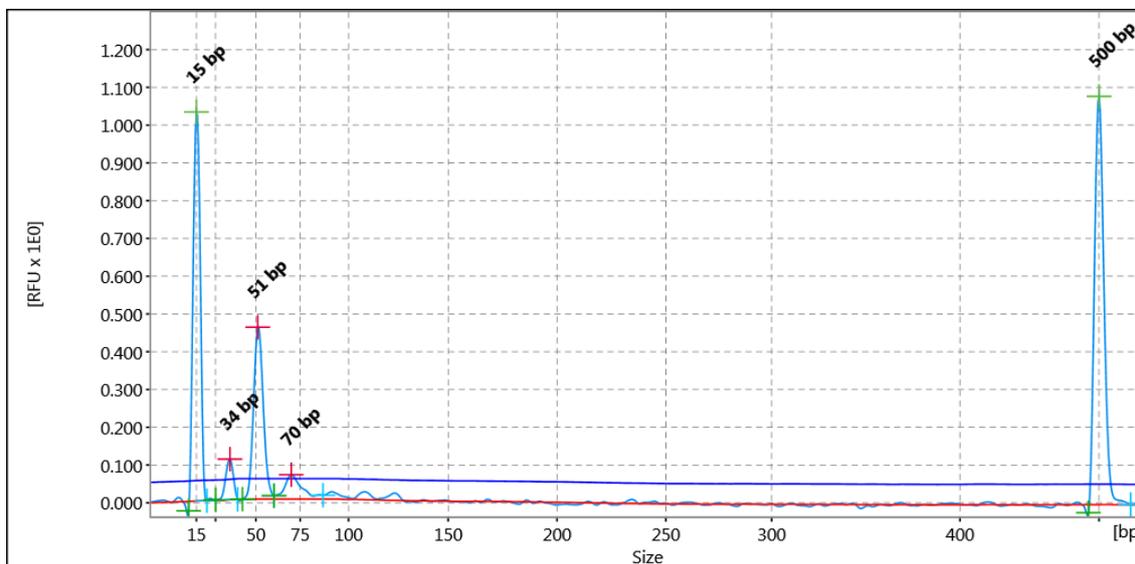


Figure: 37

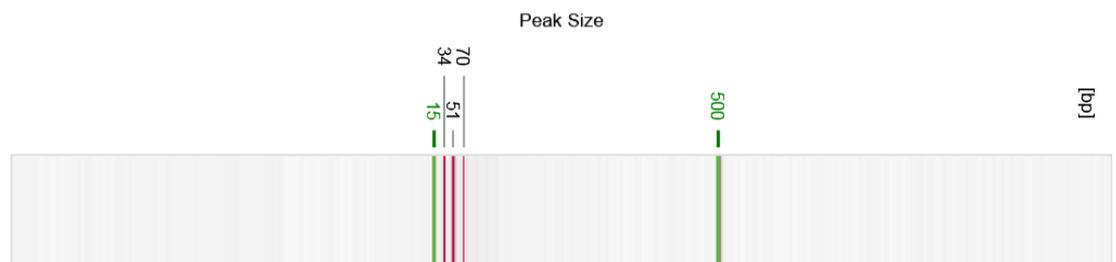


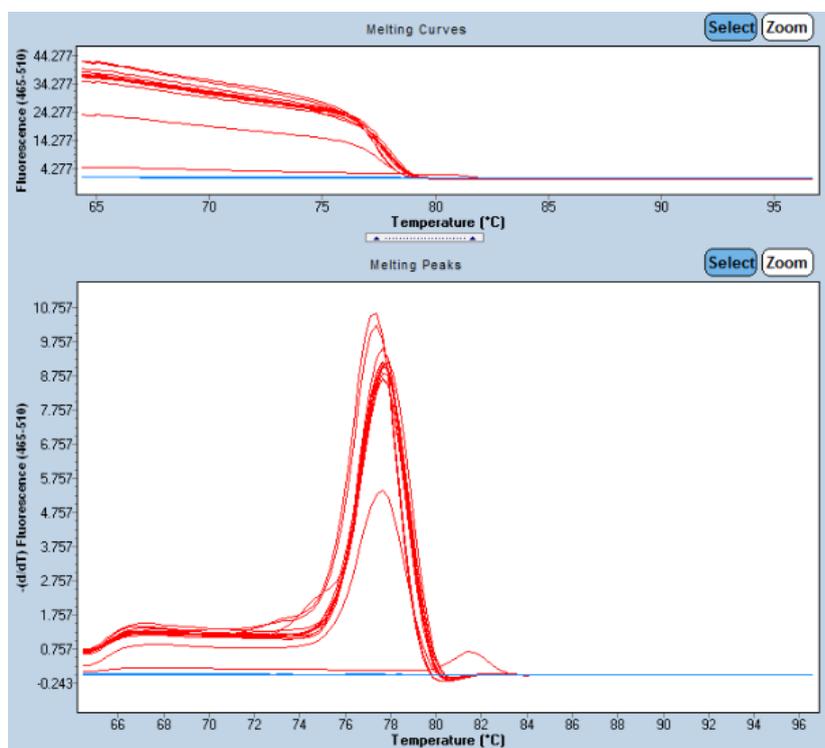
Figure: 38

Run			
Instrument ID:	12731	Cartridge ID:	C190804A02
Cartridge Calibration Status:	OK	Cartridge Expiry Date:	4/30/2020
Applied Method:	AM420	Method Injection Time:	10 sec.
Method Separation Time:	420 sec.	Method Injection Voltage:	5.0 kV
Method Separation Voltage:	5.0 kV		

ANEXO 8. Curvas de *melting* miR-122-5p

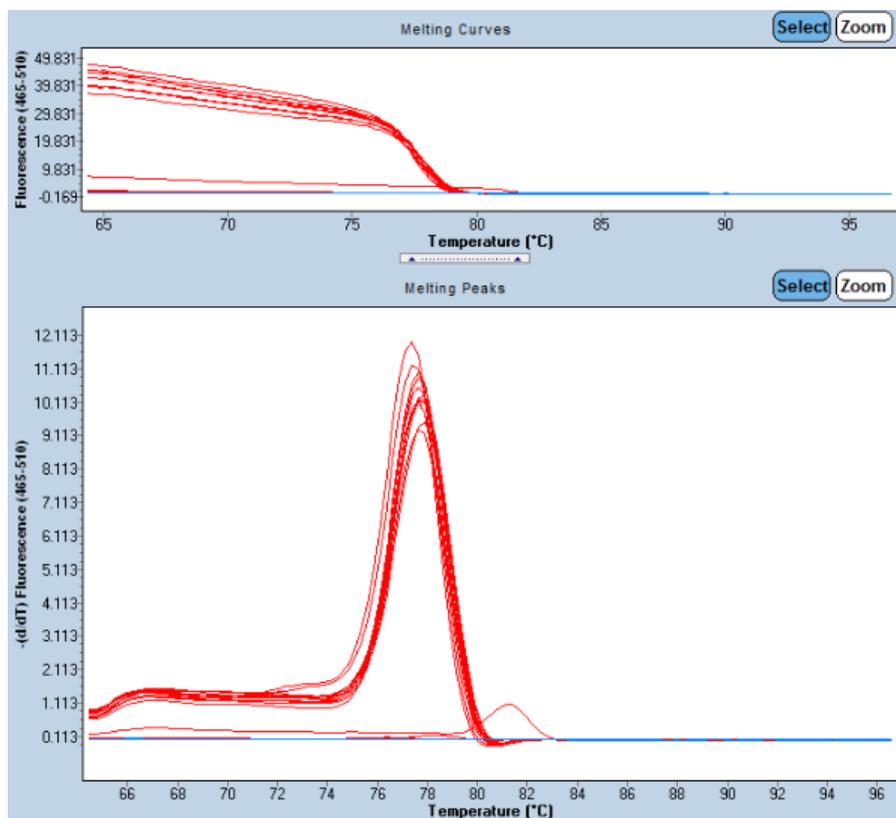
Condición 1 (0.25F-0.25R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	77.67	13.61	2.47	5.52
10 ⁷ copias RT1	77.29	26.71	2.47	10.81
10 ⁷ copias RT1	77.77	23.49	2.54	9.23
10 ⁵ copias RT1	77.72	21.95	2.48	8.86
10 ⁵ copias RT1	77.76	22.79	2.46	9.28
10 ⁵ copias RT1	77.70	22.46	2.57	8.75
10 ⁷ copias RT2	77.38	25.10	2.41	10.41
10 ⁷ copias RT2	77.88	23.56	2.51	9.40
10 ⁷ copias RT2	77.80	23.06	2.54	9.07
10 ⁵ copias RT2	77.74	22.76	2.43	9.38
10 ⁵ copias RT2	77.71	23.44	2.40	9.79
10 ⁵ copias RT2	77.70	23.28	2.48	9.38
NTC RT1	81.58	1.46	2.13	0.68
NTC RT1				
NTC RT1				
NTC RT2				
NTC RT2				
NTC RT2				
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



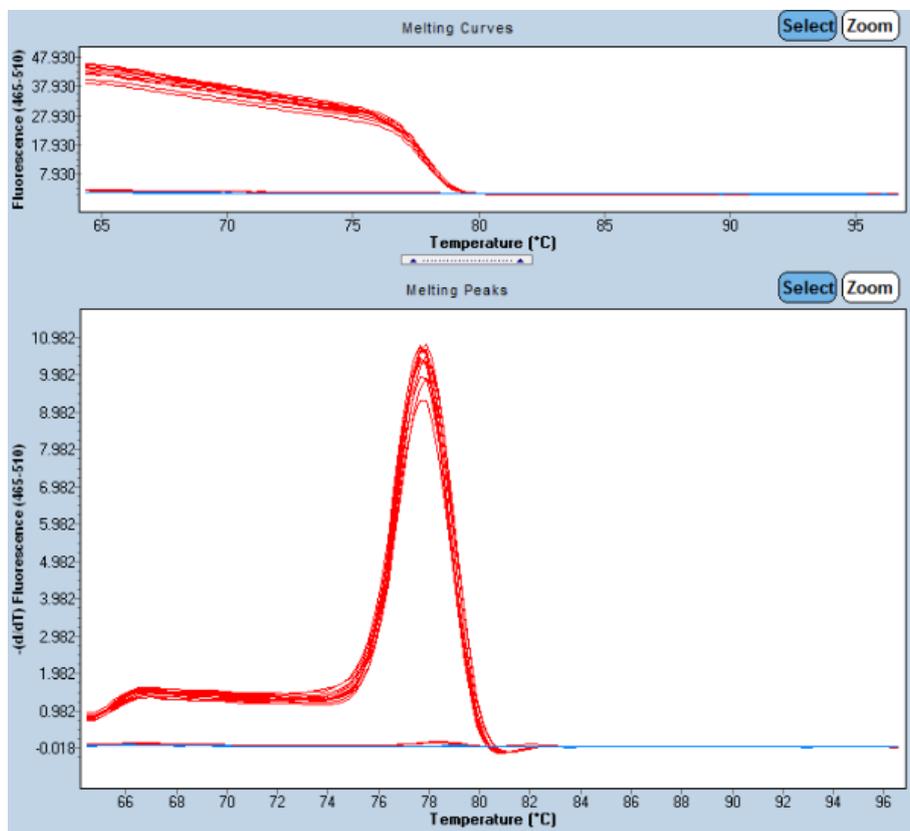
Condición 2 (0.25F-0.5R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	77.39	30.50	2.51	12.17
10 ⁷ copias RT1	77.50	29.12	2.54	11.48
10 ⁷ copias RT1	77.90	25.25	2.59	9.76
10 ⁵ copias RT1	77.67	25.04	2.41	10.40
10 ⁵ copias RT1	77.71	25.31	2.45	10.34
10 ⁵ copias RT1	77.77	24.13	2.54	9.52
10 ⁷ copias RT2	77.83	26.60	2.54	10.47
10 ⁷ copias RT2	77.81	26.69	2.56	10.42
10 ⁷ copias RT2	77.86	26.89	2.54	10.57
10 ⁵ copias RT2	77.72	27.56	2.45	11.24
10 ⁵ copias RT2	77.76	28.00	2.52	11.11
10 ⁵ copias RT2	77.72	27.01	2.49	10.84
NTC RT1				
NTC RT1	78.52	0.25	1.79	0.14
NTC RT1				
NTC RT2				
NTC RT2	81.34	2.28	2.10	1.08
NTC RT2	76.84	0.14	1.96	0.07
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



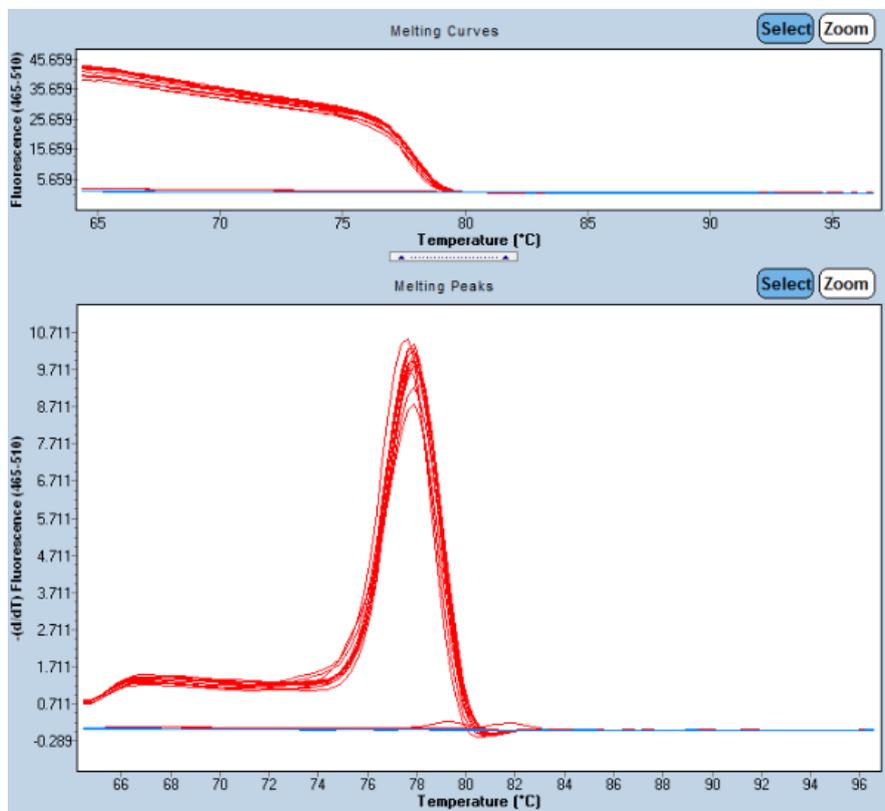
Condición 3 (0.25F-1R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	77.79	27.25	2.55	10.70
10 ⁷ copias RT1	77.94	27.78	2.59	10.75
10 ⁷ copias RT1	77.96	26.36	2.60	10.14
10 ⁵ copias RT1	77.76	26.57	2.48	10.69
10 ⁵ copias RT1	77.83	23.84	2.50	9.54
10 ⁵ copias RT1	77.83	25.35	2.49	10.16
10 ⁷ copias RT2	77.74	27.45	2.51	10.95
10 ⁷ copias RT2	77.85	27.64	2.54	10.89
10 ⁷ copias RT2	77.91	28.45	2.56	11.09
10 ⁵ copias RT2	77.75	26.88	2.44	11.02
10 ⁵ copias RT2	77.80	26.17	2.46	10.63
10 ⁵ copias RT2	77.85	27.40	2.50	10.94
NTC RT1				
NTC RT1	81.22	0.87	2.02	0.11
NTC RT1				
NTC RT2	78.66	0.17	1.76	0.10
NTC RT2				
NTC RT2	81.75	0.19	5.83	0.03
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



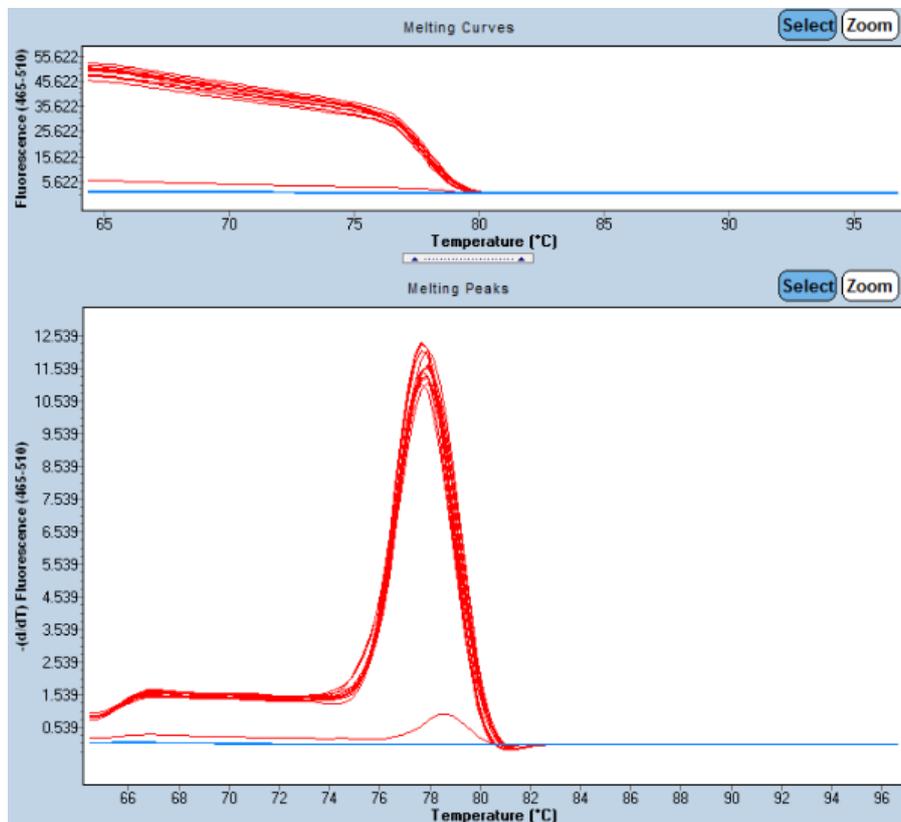
Condición 4 (0.5F-0.25R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	77.93	24.23	2.56	9.45
10 ⁷ copias RT1	77.95	25.97	2.59	10.04
10 ⁷ copias RT1	77.71	25.12	2.53	9.92
10 ⁵ copias RT1	77.59	26.26	2.45	10.72
10 ⁵ copias RT1	77.82	24.00	2.68	8.96
10 ⁵ copias RT1	77.85	25.94	2.54	10.21
10 ⁷ copias RT2	77.90	26.96	2.57	10.51
10 ⁷ copias RT2	77.97	26.36	2.58	10.20
10 ⁷ copias RT2	77.96	26.71	2.58	10.36
10 ⁵ copias RT2	77.84	26.06	2.48	10.52
10 ⁵ copias RT2	77.90	26.20	2.45	10.68
10 ⁵ copias RT2	77.97	25.37	2.53	10.04
NTC RT1	81.68	0.60	4.49	0.13
NTC RT1	79.57	0.37	1.79	0.21
NTC RT1				
NTC RT2	78.82	0.24	2.60	0.09
NTC RT2				
NTC RT2	78.64	0.60	2.29	0.26
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



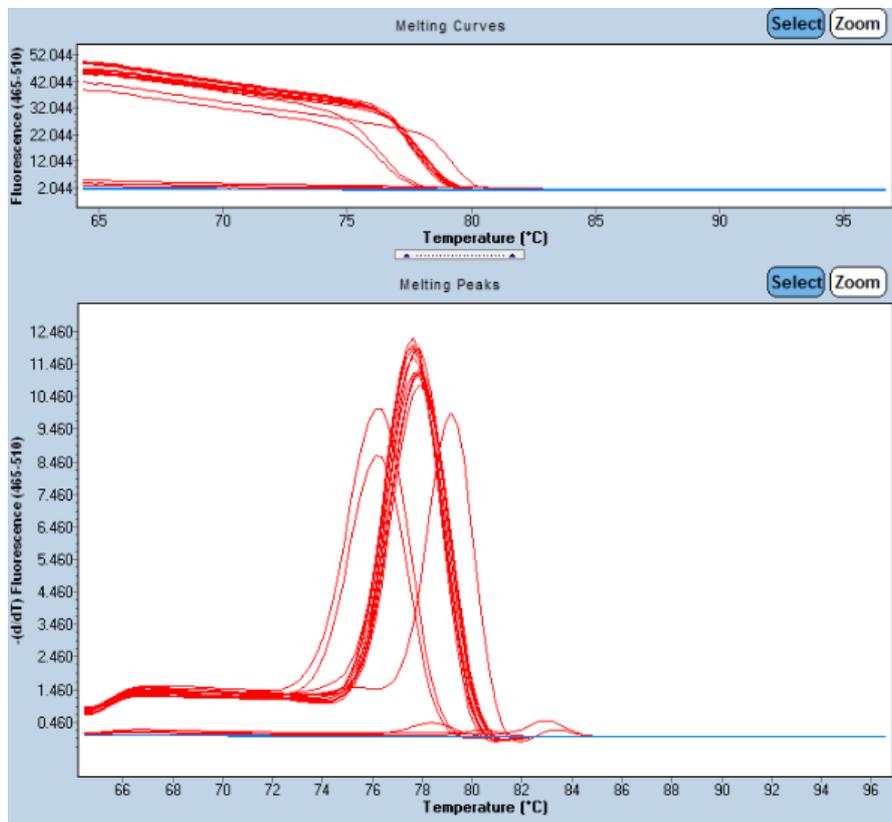
Condición 5 (0.5F-0.5R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	77.95	32.86	2.75	11.94
10 ⁷ copias RT1	78.00	31.74	2.78	11.41
10 ⁷ copias RT1	77.97	33.17	2.77	11.98
10 ⁵ copias RT1	77.89	32.61	2.82	11.56
10 ⁵ copias RT1	77.81	33.98	2.70	12.59
10 ⁵ copias RT1	77.82	30.16	2.56	11.77
10 ⁷ copias RT2	78.03	34.70	2.79	12.44
10 ⁷ copias RT2	78.03	33.43	2.79	11.98
10 ⁷ copias RT2	77.91	31.39	2.71	11.60
10 ⁵ copias RT2	77.82	31.71	2.55	12.42
10 ⁵ copias RT2	77.82	33.14	2.62	12.67
10 ⁵ copias RT2	77.81	29.73	2.62	11.35
NTC RT1				
NTC RT1	78.68	2.13	2.22	0.96
NTC RT1				
NTC RT2				
NTC RT2				
NTC RT2				
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



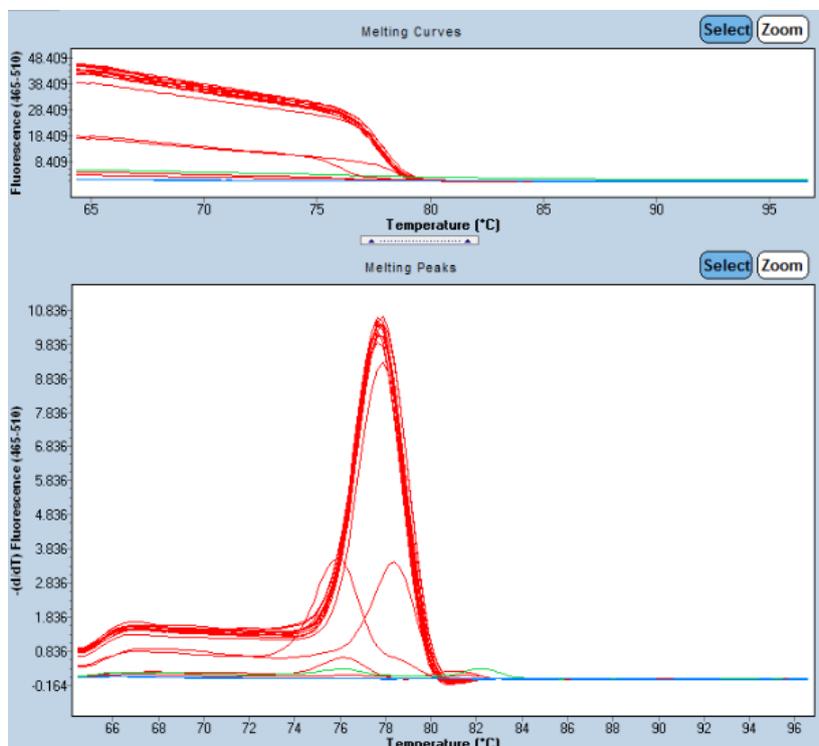
Condición 6 (0.5F-1R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	78.01	30.23	2.71	11.16
10 ⁷ copias RT1	77.97	31.69	2.72	11.66
10 ⁷ copias RT1	77.97	31.18	2.70	11.54
10 ⁵ copias RT1	77.82	31.20	2.73	11.57
10 ⁵ copias RT1	77.77	31.59	2.64	11.98
10 ⁵ copias RT1	77.85	31.01	2.69	11.54
10 ⁷ copias RT2	77.67	32.43	2.58	12.57
10 ⁷ copias RT2	77.94	31.12	2.69	11.56
10 ⁷ copias RT2	77.90	32.90	2.67	12.31
10 ⁵ copias RT2	77.72	32.53	2.62	12.41
10 ⁵ copias RT2	77.73	32.30	2.64	12.23
10 ⁵ copias RT2	77.68	32.78	2.65	12.37
NTC RT1	76.33	30.34	2.92	10.39
NTC RT1	83.09	1.13	2.45	0.46
NTC RT1	80.75	0.28	1.77	0.16
NTC RT2	78.50	1.01	2.28	0.44
NTC RT2	76.33	24.72	2.79	8.86
NTC RT2	79.22	22.23	2.19	10.15
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



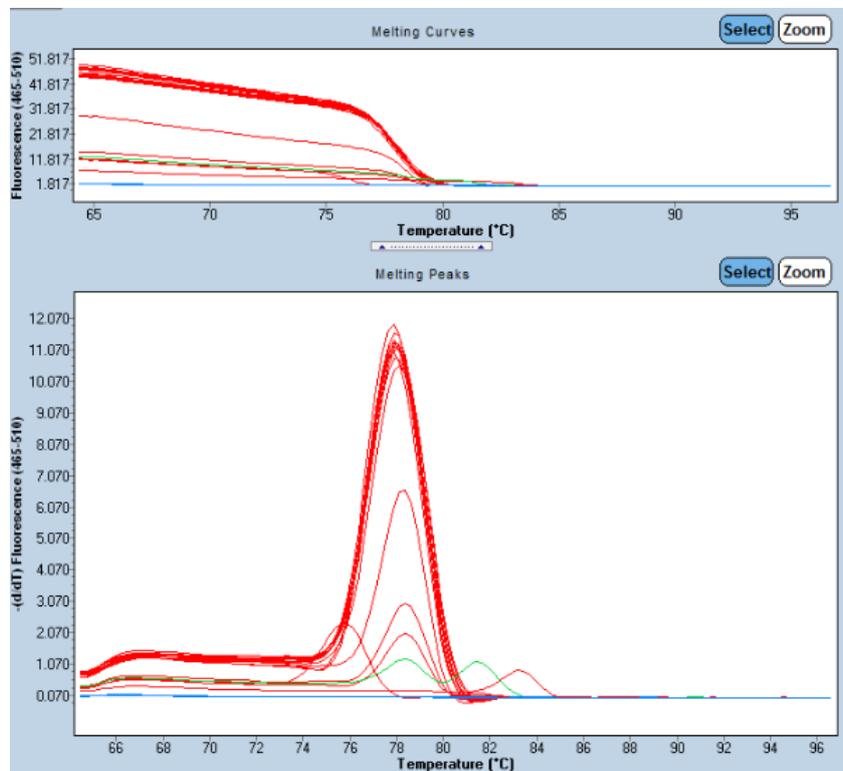
Condición 7 (1F-0.25R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	77.74	27.04	2.51	10.76
10 ⁷ copias RT1	77.85	26.33	2.55	10.31
10 ⁷ copias RT1	77.95	27.81	2.60	10.71
10 ⁵ copias RT1	77.77	26.51	2.49	10.65
10 ⁵ copias RT1	77.72	26.00	2.56	10.14
10 ⁵ copias RT1	77.95	23.97	2.51	9.56
10 ⁷ copias RT2	77.70	26.02	2.49	10.44
10 ⁷ copias RT2	77.84	27.21	2.55	10.67
10 ⁷ copias RT2	77.93	28.18	2.58	10.94
10 ⁵ copias RT2	77.84	26.48	2.49	10.64
10 ⁵ copias RT2	77.83	25.63	2.47	10.36
10 ⁵ copias RT2	77.77	27.48	2.52	10.89
NTC RT1	76.29	1.03	1.61	0.64
NTC RT1	81.53	0.37	1.77	0.21
NTC RT1	78.44	7.54	2.16	3.49
NTC RT2	76.03/ 82.43	0.26/ 0.62	2.16/ 2.78	0.12/ 0.22
NTC RT2	75.86	8.54	2.43	3.51
NTC RT2				
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



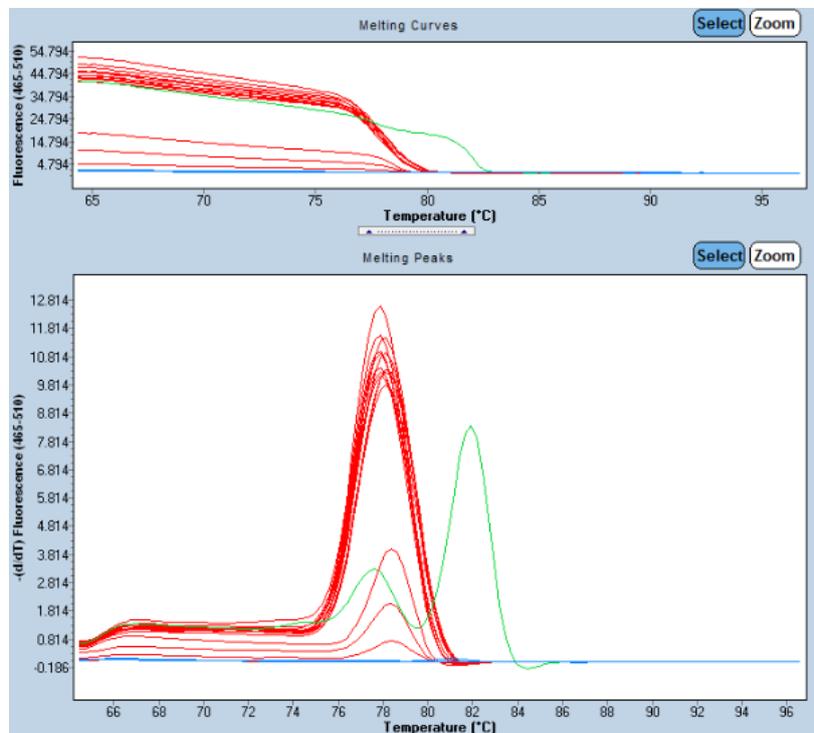
Condición 8 (1F-0.5R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	78.08	30.37	2.73	11.11
10 ⁷ copias RT1	78.05	32.66	2.73	11.95
10 ⁷ copias RT1	78.22	30.26	2.77	10.93
10 ⁵ copias RT1	77.96	30.09	2.66	11.31
10 ⁵ copias RT1	78.00	31.08	2.68	11.60
10 ⁵ copias RT1	78.05	30.95	2.68	11.56
10 ⁷ copias RT2	78.06	32.02	2.75	11.65
10 ⁷ copias RT2	78.05	31.92	2.74	11.65
10 ⁷ copias RT2	78.15	31.85	2.77	11.52
10 ⁵ copias RT2	77.96	32.73	2.67	12.25
10 ⁵ copias RT2	78.00	31.49	2.69	11.71
10 ⁵ copias RT2	78.09	31.01	2.70	11.49
NTC RT1	83.36	1.95	2.31	0.84
NTC RT1	78.48	4.77	2.31	2.06
NTC RT1	75.90	5.27	2.19	2.40
NTC RT2	78.45	6.70	2.19	3.05
NTC RT2	78.36	14.14	2.10	6.73
NTC RT2	78.52/ 81.70	1.47/ 2.35	1.90/ 2.16	0.77/ 1.09
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



Condición 9 (1F-1R)

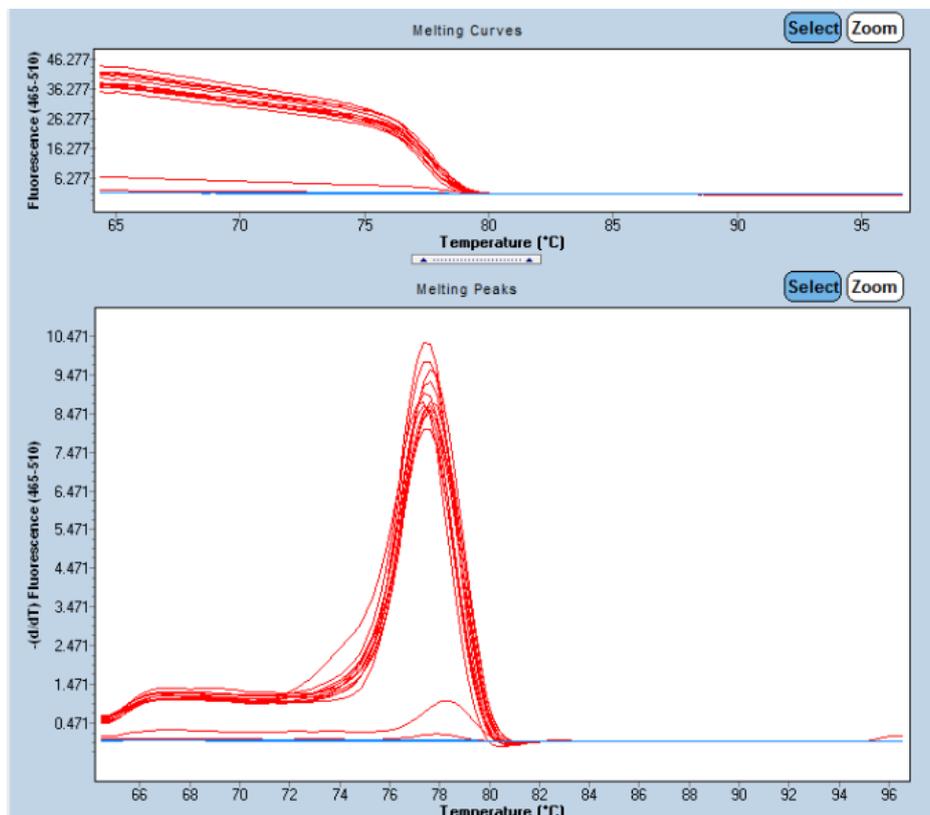
Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	78.31	30.56	2.85	10.72
10 ⁷ copias RT1	78.27	30.45	2.86	10.63
10 ⁷ copias RT1	78.24	29.06	2.85	10.19
10 ⁵ copias RT1	77.96	29.68	2.75	10.79
10 ⁵ copias RT1	77.96	31.57	2.77	11.41
10 ⁵ copias RT1	78.05	29.98	2.82	10.62
10 ⁷ copias RT2	77.96	35.34	2.72	13.01
10 ⁷ copias RT2	78.17	33.68	2.83	11.92
10 ⁷ copias RT2	78.20	32.10	2.83	11.35
10 ⁵ copias RT2	77.98	31.28	2.78	11.27
10 ⁵ copias RT2	77.95	33.08	2.76	11.99
10 ⁵ copias RT2	78.05	29.48	2.81	10.47
NTC RT1	78.40	4.47	2.13	2.10
NTC RT1	77.57/ 81.93	4.25/ 17.63	1.81/ 2.05	2.36/ 8.60
NTC RT1	78.45	8.91	2.17	4.11
NTC RT2	78.50	1.73	2.33	0.74
NTC RT2				
NTC RT2				
BqPCR	75.47	0.26	9.87	0.03
BqPCR				
BqPCR				



ANEXO 9. Curvas de *melting* miR-223-5p

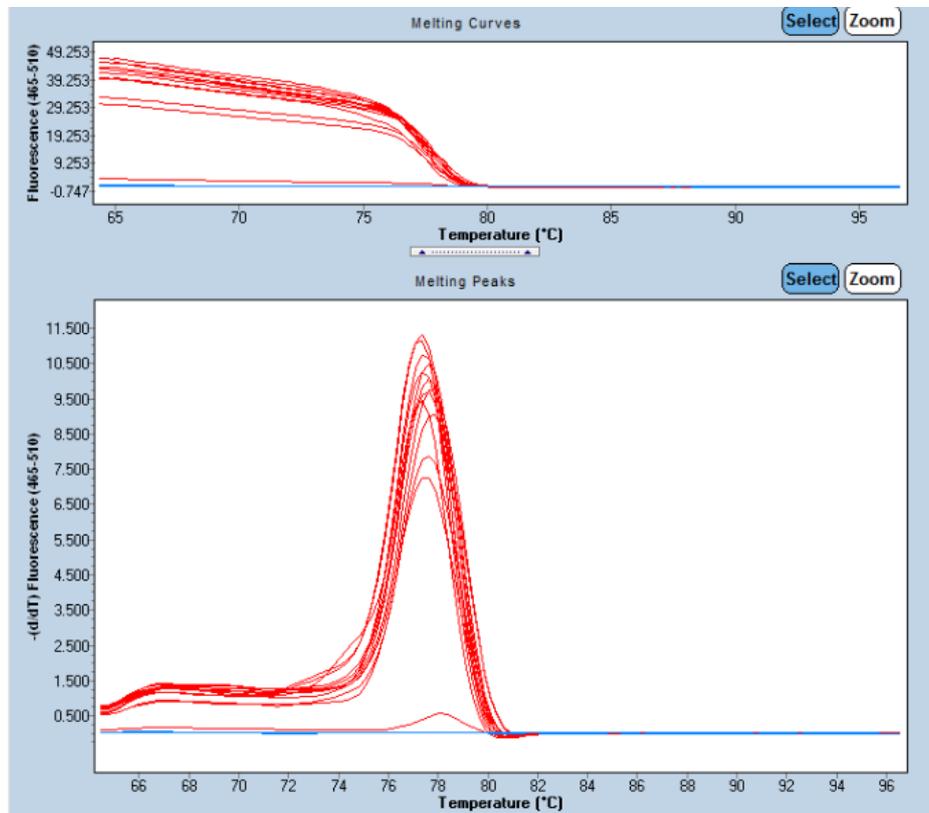
Condición 1 (0.25F-0.25R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	77.48	25.09	2.74	9.16
10 ⁷ copias RT1	77.53	23.26	2.82	8.25
10 ⁷ copias RT1	77.76	25.76	2.87	8.98
10 ⁵ copias RT1	77.71	24.68	2.81	8.78
10 ⁵ copias RT1	77.21	26.50	3.01	8.80
10 ⁵ copias RT1	77.69	24.74	2.77	8.94
10 ⁷ copias RT2	77.45	24.13	2.73	8.83
10 ⁷ copias RT2	77.51	28.83	2.74	10.53
10 ⁷ copias RT2	77.76	27.66	2.81	9.83
10 ⁵ copias RT2	77.62	24.80	2.86	8.66
10 ⁵ copias RT2	77.63	26.92	2.84	9.49
10 ⁵ copias RT2	77.59	27.69	2.73	10.13
NTC RT1	78.41	2.31	2.17	1.06
NTC RT1	78.11	0.34	1.84	0.18
NTC RT1				
NTC RT2				
NTC RT2				
NTC RT2				
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



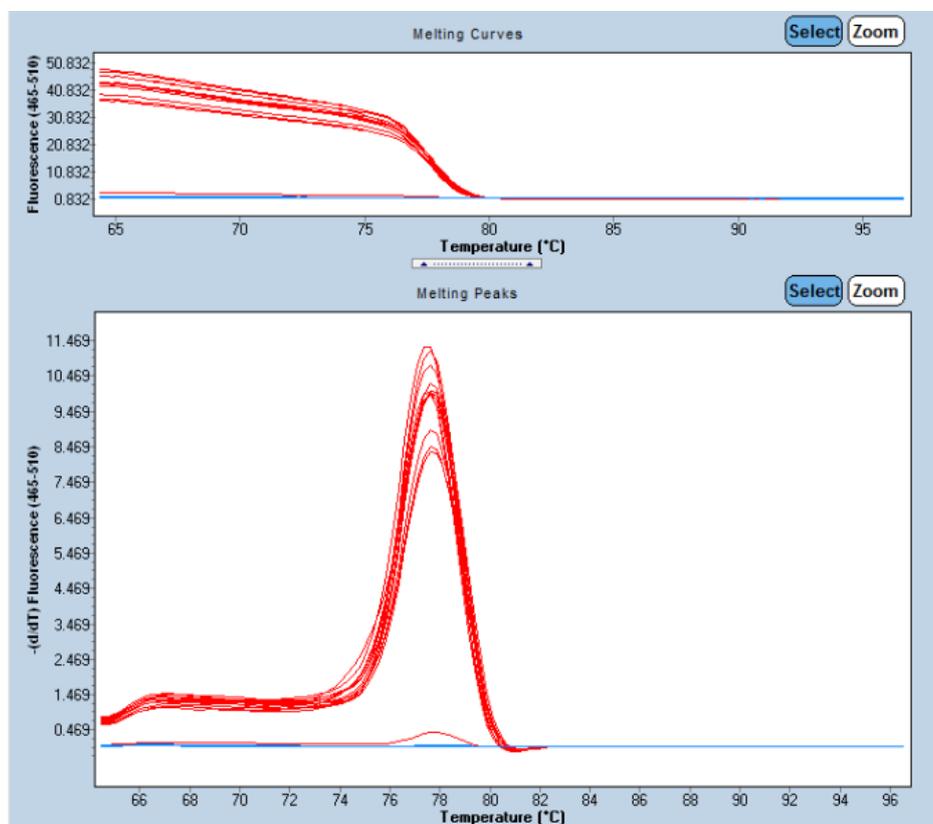
Condición 2 (0.25F-0.5R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	77.30	31.64	2.78	11.39
10 ⁷ copias RT1	77.37	32.51	2.81	11.57
10 ⁷ copias RT1	77.86	27.11	2.91	9.32
10 ⁵ copias RT1	77.32	26.39	2.79	9.47
10 ⁵ copias RT1	77.60	20.42	2.73	7.49
10 ⁵ copias RT1	77.68	22.52	2.78	8.11
10 ⁷ copias RT2	77.70	28.91	2.80	10.34
10 ⁷ copias RT2	77.69	30.03	2.79	10.75
10 ⁷ copias RT2	77.85	28.75	2.85	10.08
10 ⁵ copias RT2	77.50	28.72	2.72	10.56
10 ⁵ copias RT2	77.55	30.18	2.73	11.06
10 ⁵ copias RT2	77.65	27.88	2.78	10.01
NTC RT1	78.21	1.21	2.11	0.57
NTC RT1				
NTC RT1				
NTC RT2				
NTC RT2				
NTC RT2				
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



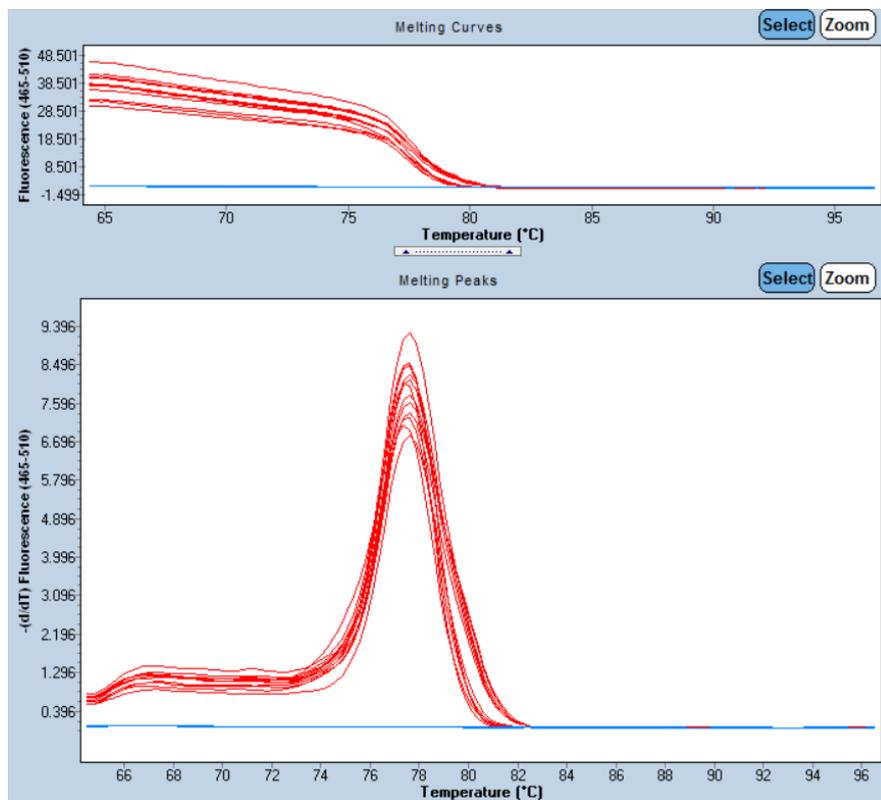
Condición 3 (0.25F-1R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	77.61	28.29	2.78	10.16
10 ⁷ copias RT1	77.76	24.92	2.86	8.70
10 ⁷ copias RT1	77.80	24.63	2.87	8.59
10 ⁵ copias RT1	77.76	25.95	2.83	9.19
10 ⁵ copias RT1	77.71	28.59	2.79	10.25
10 ⁵ copias RT1	77.79	29.53	2.84	10.39
10 ⁷ copias RT2	77.57	28.14	2.75	10.25
10 ⁷ copias RT2	77.54	32.06	2.76	11.61
10 ⁷ copias RT2	77.75	28.90	2.81	10.30
10 ⁵ copias RT2	77.71	30.75	2.76	11.14
10 ⁵ copias RT2	77.66	30.26	2.90	10.44
10 ⁵ copias RT2	77.68	31.63	2.75	11.49
NTC RT1				
NTC RT1				
NTC RT1				
NTC RT2				
NTC RT2	77.92	0.88	2.09	0.42
NTC RT2				
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



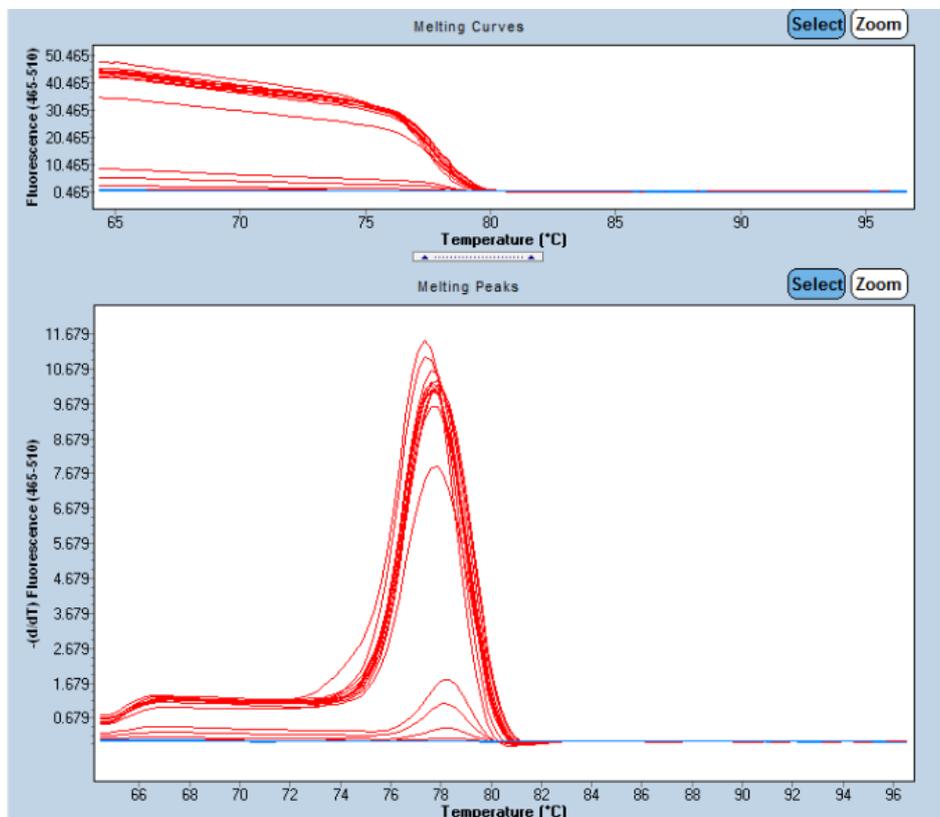
Condición 4 (0.5F-0.25R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	77.90	27.35	3.60	7.60
10 ⁷ copias RT1	77.93	27.33	3.68	7.43
10 ⁷ copias RT1	77.84	24.26	3.35	7.25
10 ⁵ copias RT1	77.54	20.41	2.86	7.13
10 ⁵ copias RT1	77.62	21.61	2.95	7.32
10 ⁵ copias RT1	77.75	20.47	2.96	6.91
10 ⁷ copias RT2	77.88	27.25	3.35	8.13
10 ⁷ copias RT2	77.84	30.30	3.33	9.11
10 ⁷ copias RT2	77.84	26.68	3.33	8.01
10 ⁵ copias RT2	77.48	24.06	2.98	8.07
10 ⁵ copias RT2	77.64	24.44	2.84	8.61
10 ⁵ copias RT2	77.61	24.88	2.88	8.65
NTC RT1				
NTC RT1				
NTC RT1				
NTC RT2				
NTC RT2				
NTC RT2				
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



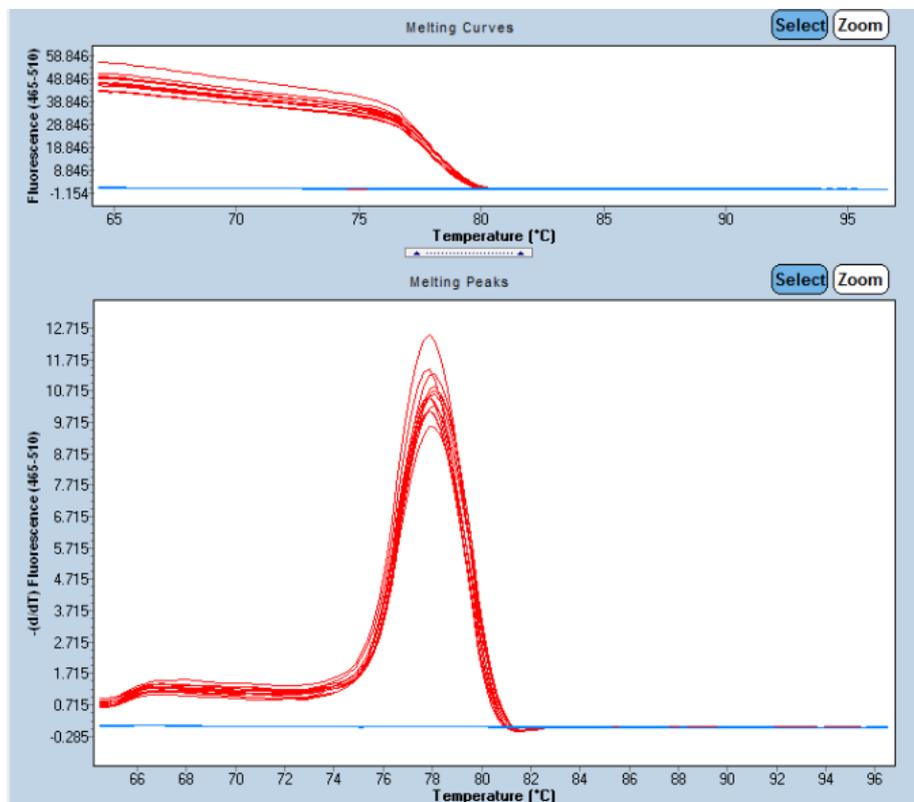
Condición 5 (0.5F-0.5R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	77.74	31.74	2.90	10.94
10 ⁷ copias RT1	77.88	31.07	2.90	10.71
10 ⁷ copias RT1	77.70	30.51	2.87	10.61
10 ⁵ copias RT1	77.75	30.35	2.89	10.51
10 ⁵ copias RT1	77.77	30.71	2.96	10.39
10 ⁵ copias RT1	77.83	29.24	2.95	9.91
10 ⁷ copias RT2	77.88	23.65	2.90	8.16
10 ⁷ copias RT2	77.96	31.11	2.95	10.55
10 ⁷ copias RT2	78.00	31.26	2.95	10.58
10 ⁵ copias RT2	77.80	30.43	2.91	10.45
10 ⁵ copias RT2	77.40	33.18	2.83	11.71
10 ⁵ copias RT2	77.53	32.31	2.85	11.34
NTC RT1				
NTC RT1	78.13	1.19	1.98	3.63
NTC RT1	78.32	0.86	2.14	0.40
NTC RT2	78.65	0.18	1.79	0.10
NTC RT2	78.24	2.38	2.15	1.11
NTC RT2	78.33	3.46	1.91	1.81
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



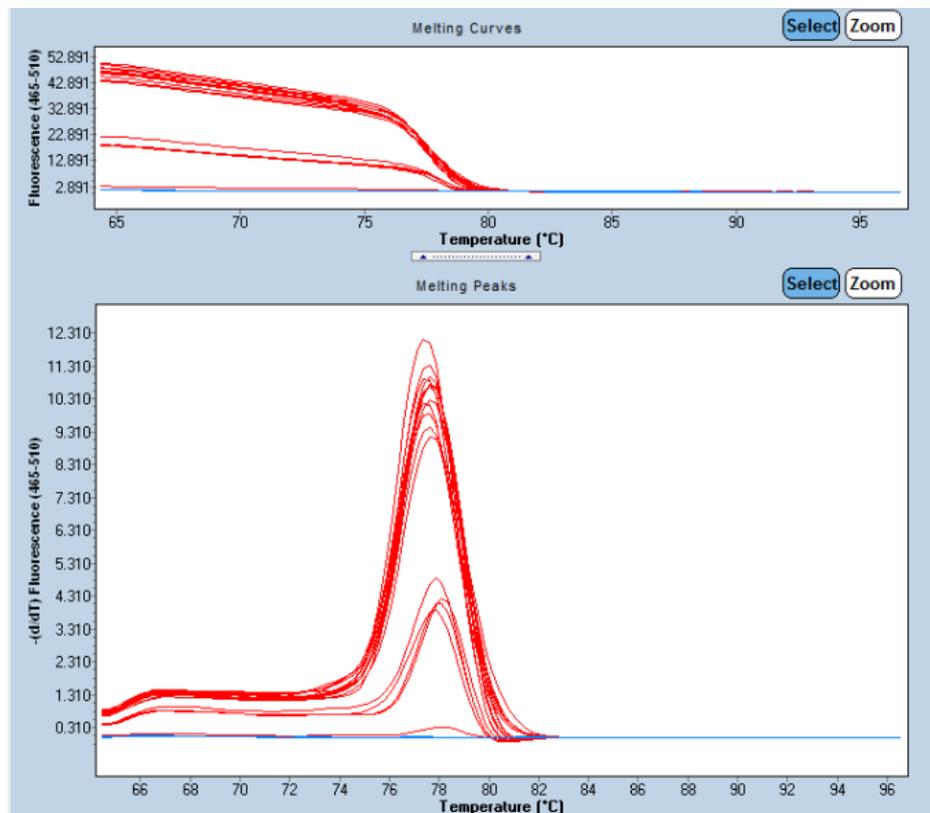
Condición 6 (0.5F-1R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	78.15	32.78	3.07	10.69
10 ⁷ copias RT1	78.19	34.70	3.10	11.21
10 ⁷ copias RT1	78.14	33.75	3.05	11.06
10 ⁵ copias RT1	78.10	30.63	3.07	9.98
10 ⁵ copias RT1	77.95	31.52	3.01	10.47
10 ⁵ copias RT1	77.94	31.97	3.05	10.47
10 ⁷ copias RT2	78.18	34.89	3.08	11.34
10 ⁷ copias RT2	78.14	35.95	3.06	11.75
10 ⁷ copias RT2	77.90	34.58	2.93	11.79
10 ⁵ copias RT2	77.97	39.63	3.05	12.99
10 ⁵ copias RT2	78.01	33.07	3.03	10.93
10 ⁵ copias RT2	77.93	33.11	3.03	10.94
NTC RT1				
NTC RT1				
NTC RT1				
NTC RT2				
NTC RT2	70.70	0.31	9.00	0.03
NTC RT2				
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



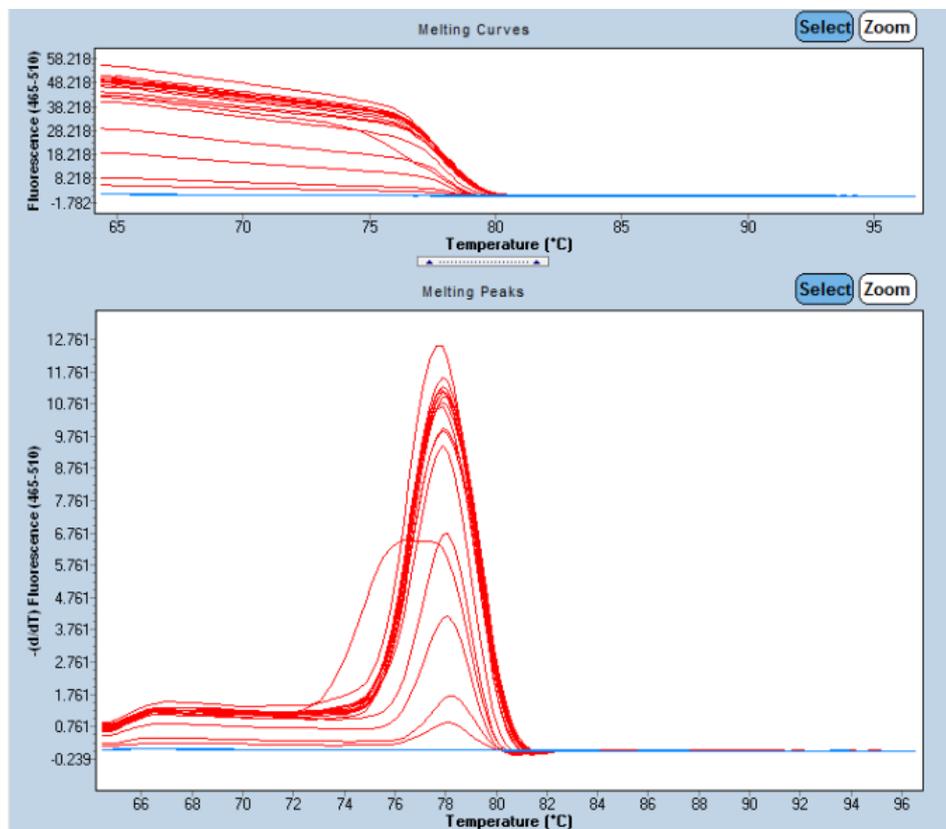
Condición 7 (1F-0.25R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	77.68	30.53	3.06	9.99
10 ⁷ copias RT1	77.74	29.50	3.08	9.56
10 ⁷ copias RT1	77.93	29.91	3.23	9.27
10 ⁵ copias RT1	77.54	32.04	2.86	11.19
10 ⁵ copias RT1	77.78	32.16	2.91	11.03
10 ⁵ copias RT1	77.79	32.03	2.88	11.13
10 ⁷ copias RT2	77.60	31.00	3.02	10.25
10 ⁷ copias RT2	77.74	33.29	3.07	10.83
10 ⁷ copias RT2	77.81	31.84	3.05	10.45
10 ⁵ copias RT2	77.64	33.14	2.84	11.69
10 ⁵ copias RT2	77.51	34.61	2.77	12.49
10 ⁵ copias RT2	77.71	32.47	2.89	11.23
NTC RT1	77.93	11.12	2.26	4.93
NTC RT1	78.09	8.52	2.05	4.16
NTC RT1	78.19	0.76	2.30	0.33
NTC RT2	77.88	8.85	2.24	3.94
NTC RT2				
NTC RT2	78.22	9.02	2.10	4.30
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



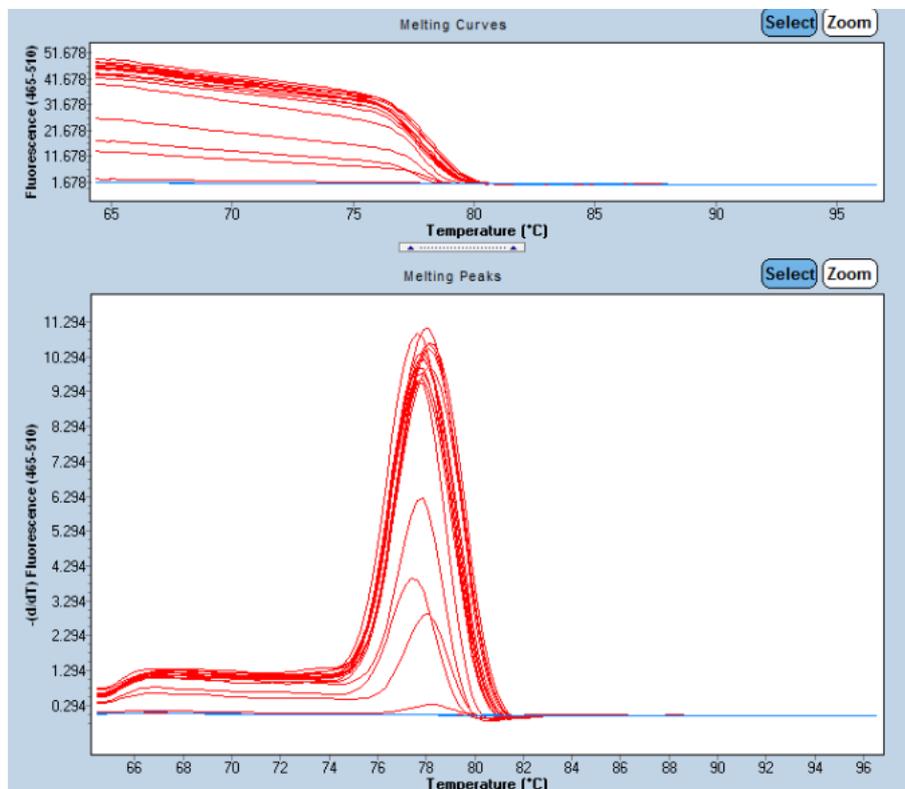
Condición 8 (1F-0.5R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	77.99	34.54	3.00	11.50
10 ⁷ copias RT1	78.00	36.07	3.01	11.97
10 ⁷ copias RT1	78.09	34.13	2.99	11.41
10 ⁵ copias RT1	77.91	32.47	2.94	11.06
10 ⁵ copias RT1	78.00	33.48	2.97	11.25
10 ⁵ copias RT1	78.06	31.01	2.99	10.36
10 ⁷ copias RT2	78.00	35.26	3.01	11.72
10 ⁷ copias RT2	78.01	35.07	3.00	11.70
10 ⁷ copias RT2	78.05	34.65	3.00	11.54
10 ⁵ copias RT2	77.83	38.37	2.95	13.00
10 ⁵ copias RT2	77.94	34.46	2.97	11.60
10 ⁵ copias RT2	78.01	30.59	2.97	10.30
NTC RT1	78.22	1.74	1.98	0.88
NTC RT1	77.94	25.12	2.60	9.66
NTC RT1	78.13	8.83	2.07	4.27
NTC RT2	78.08	15.24	2.22	6.87
NTC RT2	76.93	30.29	4.18	7.25
NTC RT2	78.35	3.26	1.91	1.71
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



Condición 9 (1F-1R)

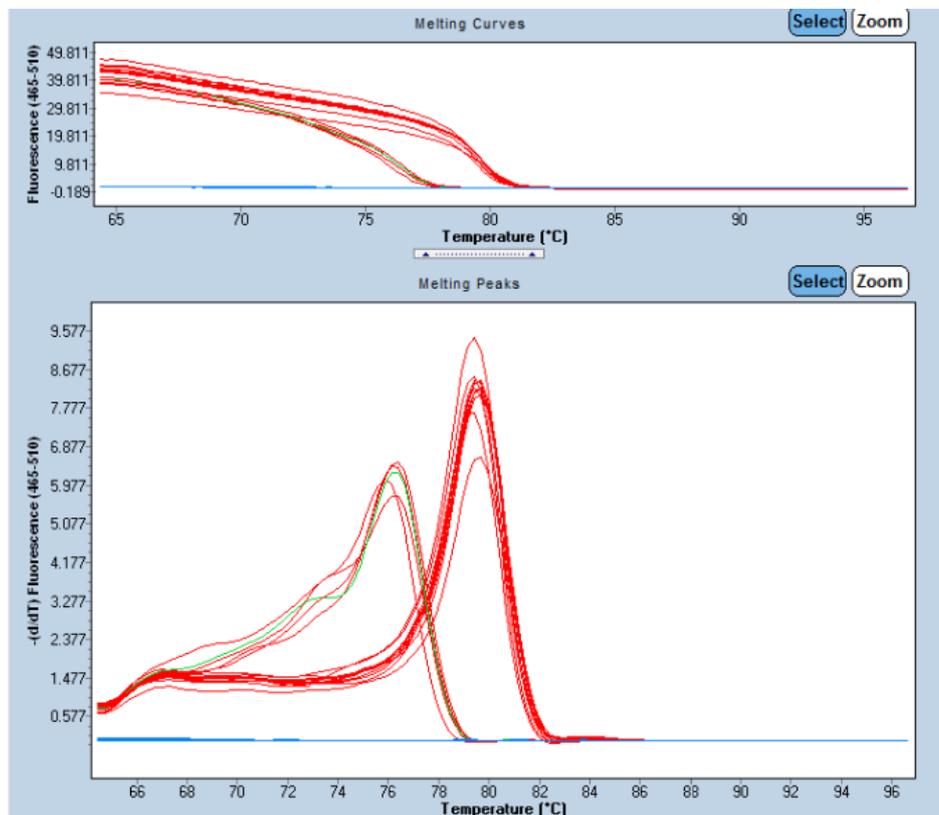
Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	77.84	29.05	2.92	9.97
10 ⁷ copias RT1	78.10	34.62	3.00	11.55
10 ⁷ copias RT1	78.20	31.55	3.03	10.41
10 ⁵ copias RT1	77.84	30.48	2.93	10.39
10 ⁵ copias RT1	77.75	33.52	2.95	11.38
10 ⁵ copias RT1	77.97	32.22	3.03	10.62
10 ⁷ copias RT2	78.28	33.96	3.06	11.11
10 ⁷ copias RT2	78.19	33.25	2.99	11.10
10 ⁷ copias RT2	78.20	33.17	3.03	10.95
10 ⁵ copias RT2	77.94	31.75	2.98	10.67
10 ⁵ copias RT2	77.92	32.17	2.97	10.84
10 ⁵ copias RT2	77.91	30.31	2.96	10.24
NTC RT1	77.82	23.66	2.43	9.75
NTC RT1	78.11	5.73	1.94	2.96
NTC RT1	78.29	0.78	2.44	0.32
NTC RT2	77.84	13.58	2.14	6.36
NTC RT2				
NTC RT2	77.56	8.50	2.12	4.01
BqPCR				
BqPCR	75.01	0.25	10.82	0.02
BqPCR				



ANEXO 10. Curvas de *melting* miR-1306-3p

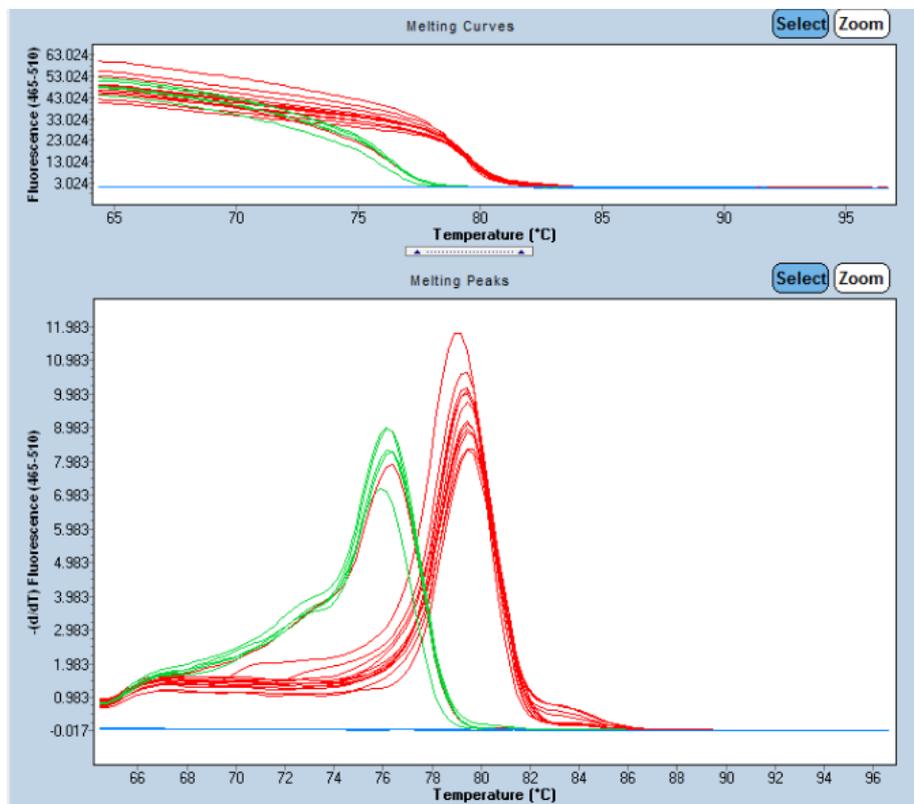
Condición1 (0.25F-0.25R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	79.60	23.39	2.84	8.22
10 ⁷ copias RT1	78.76	32.45	2.73	11.88
10 ⁷ copias RT1	79.42	27.15	2.88	9.43
10 ⁵ copias RT1	79.69	23.08	2.77	8.32
10 ⁵ copias RT1	79.36	21.58	2.77	7.78
10 ⁵ copias RT1	79.66	18.70	2.80	6.69
10 ⁷ copias RT2	79.39	23.97	2.80	8.57
10 ⁷ copias RT2	79.62	23.87	2.82	8.47
10 ⁷ copias RT2	79.64	22.74	2.82	8.07
10 ⁵ copias RT2	79.61	23.88	2.81	8.51
10 ⁵ copias RT2	79.48	23.30	2.81	8.29
10 ⁵ copias RT2	79.57	23.86	2.80	8.53
NTC RT1				
NTC RT1	76.26	21.39	3.39	6.31
NTC RT1	75.91	24.06	4.38	5.49
NTC RT2	75.82	22.26	3.80	5.86
NTC RT2	76.40/ 73.26	15.29/ 12.24	2.38/ 5.05	6.42/ 2.42
NTC RT2	76.23	23.29	3.69	6.31
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



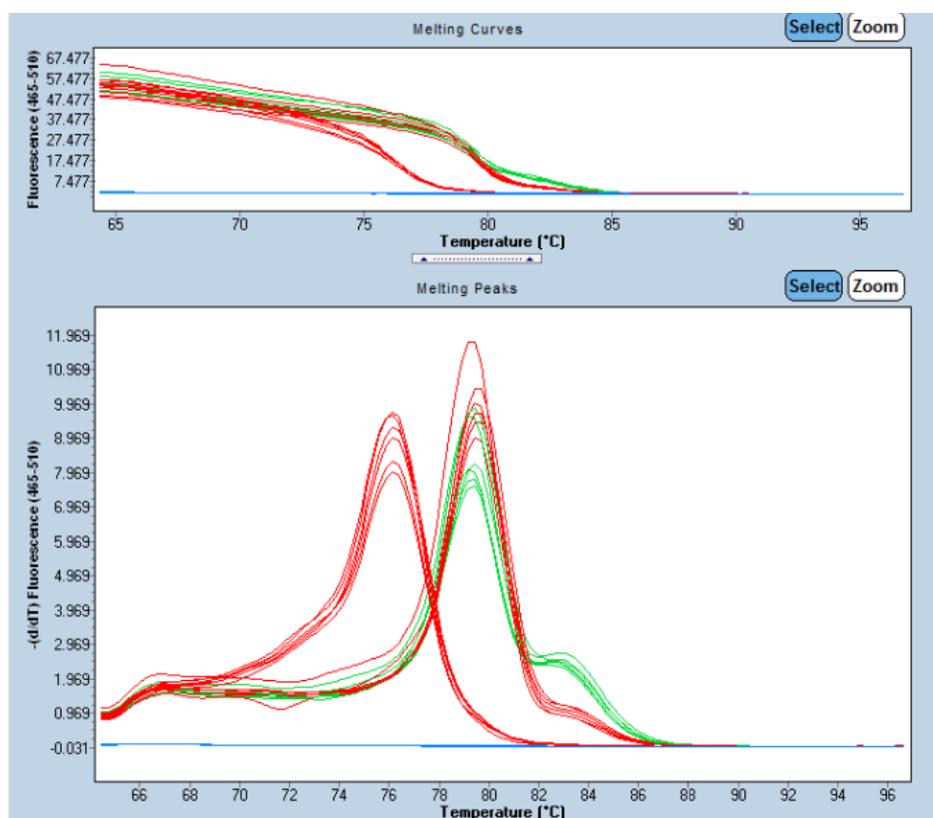
Condición 2 (0.25F-0.5R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	79.09	34.18	2.84	12.02
10 ⁷ copias RT1	79.36	33.68	3.18	10.59
10 ⁷ copias RT1	79.59	26.50	3.25	8.16
10 ⁵ copias RT1	79.53	28.63	2.93	9.79
10 ⁵ copias RT1	79.46	26.90	2.94	9.16
10 ⁵ copias RT1	79.58	26.41	2.96	8.91
10 ⁷ copias RT2	79.56	28.57	3.20	8.92
10 ⁷ copias RT2	79.43	30.81	3.12	9.88
10 ⁷ copias RT2	79.55	27.87	3.17	8.78
10 ⁵ copias RT2	79.40	29.68	2.91	10.21
10 ⁵ copias RT2	79.48	28.99	2.85	10.17
10 ⁵ copias RT2	79.68	24.55	2.89	8.49
NTC RT1	76.08/ 72.96	18.71/ 13.31	2.56/ 5.13	7.31/ 2.60
NTC RT1	76.30/73.11	24.31/14.07	2.66/ 4.92	9.13/ 2.86
NTC RT1	76.37 /73.32	24.67/12.62	2.71/ 4.69	9.10/ 2.69
NTC RT2	76.28	27.98	3.67	7.62
NTC RT2	76.37/ 73.03	23.19/ 11.80	2.72/ 4.64	8.51/ 2.54
NTC RT2	76.44 /73.41	22.20/ 12.59	2.64/ 4.66	8.42/ 2.70
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



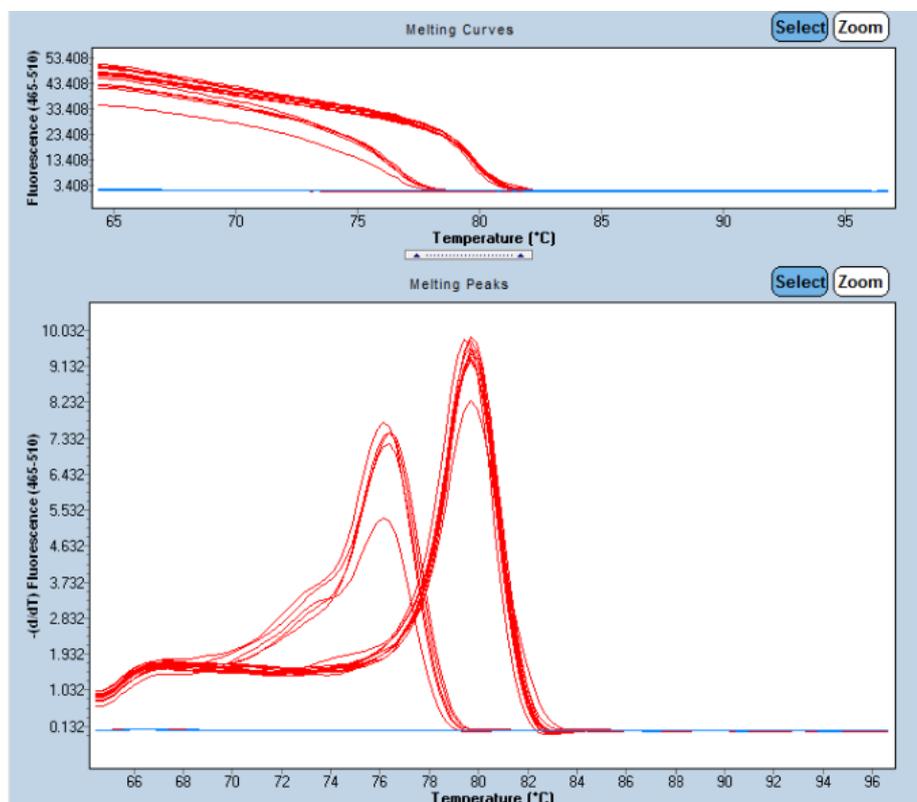
Condición 3 (0.25F-1R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	79.37/83.36	22.32/9.21	2.91/2.77	7.66/2.44
10 ⁷ copias RT1	79.39/83.37	21.12/9.53	2.82/3.83	7.48/2.49
10 ⁷ copias RT1	79.50/83.46	22.75/10.37	2.79/3.88	8.15/2.67
10 ⁵ copias RT1	79.62	28.91	3.38	8.55
10 ⁵ copias RT1	79.65	30.95	3.36	9.21
10 ⁵ copias RT1	79.58	31.71	3.26	9.72
10 ⁷ copias RT2	79.30/83.29	22.78/9.08	2.85/3.83	7.99/2.37
10 ⁷ copias RT2	79.34/83.32	27.94/8.11	2.93/3.64	9.55/2.23
10 ⁷ copias RT2	79.46/83.25	28.49/8.25	2.90/3.62	9.81/2.28
10 ⁵ copias RT2	79.40	35.78	3.07	11.64
10 ⁵ copias RT2	79.65	31.83	3.36	9.48
10 ⁵ copias RT2	79.65	33.95	3.35	10.14
NTC RT1	76.26	36.21	3.86	9.39
NTC RT1	76.32	34.96	3.87	9.04
NTC RT1	76.31	33.91	3.91	8.67
NTC RT2	76.27	31.80	4.01	7.93
NTC RT2	76.26	30.72	4.03	7.62
NTC RT2	76.16	35.90	3.81	9.43
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



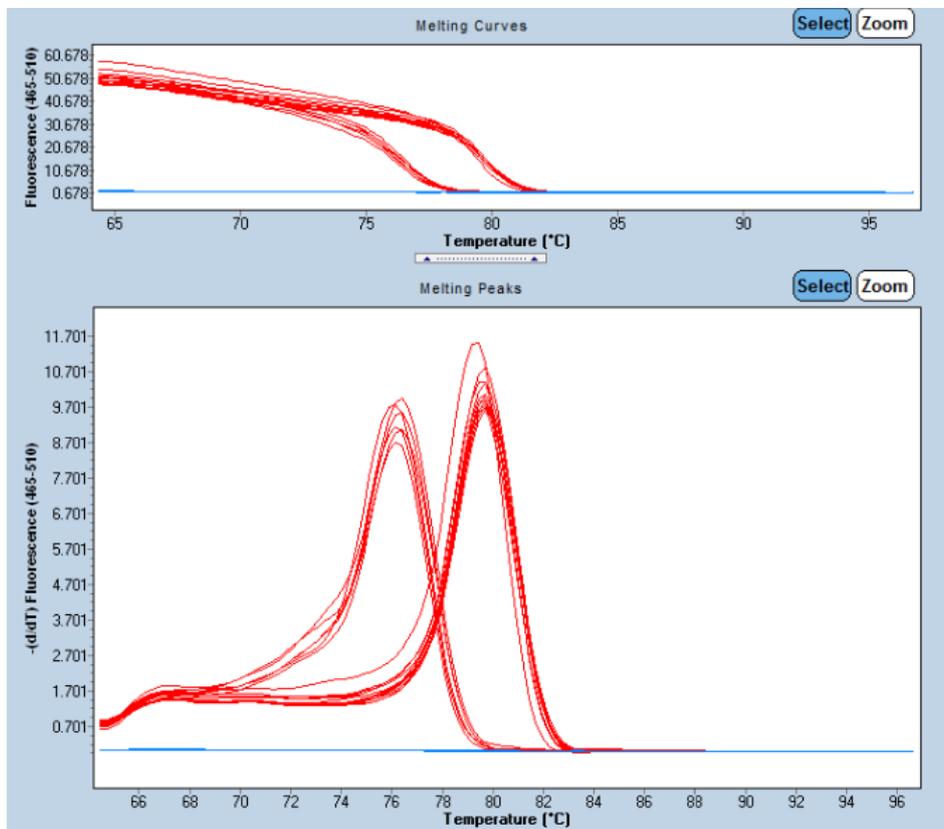
Condición4 (0.5F-0.25R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	79.87	25.32	3.10	8.17
10 ⁷ copias RT1	79.77	25.99	2.79	9.33
10 ⁷ copias RT1	79.74	26.32	2.82	9.33
10 ⁵ copias RT1	79.54	27.23	2.75	9.89
10 ⁵ copias RT1	79.70	26.32	2.80	9.40
10 ⁵ copias RT1	78.07	41.72	2.70	15.48
10 ⁷ copias RT2	79.74	27.08	2.80	9.68
10 ⁷ copias RT2	79.77	27.49	2.80	9.83
10 ⁷ copias RT2	79.82	26.92	2.84	9.48
10 ⁵ copias RT2	79.75	25.52	2.73	9.37
10 ⁵ copias RT2	79.82	27.35	2.74	9.99
10 ⁵ copias RT2	79.87	27.12	2.80	9.70
NTC RT1	75.97	20.67	4.06	5.09
NTC RT1	76.25	25.24	3.61	6.99
NTC RT1	76.39	24.46	3.27	7.49
NTC RT2	69.68	0.29	9.11	0.03
NTC RT2	76.18	26.36	3.47	7.59
NTC RT2	76.44	25.13	3.39	7.41
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



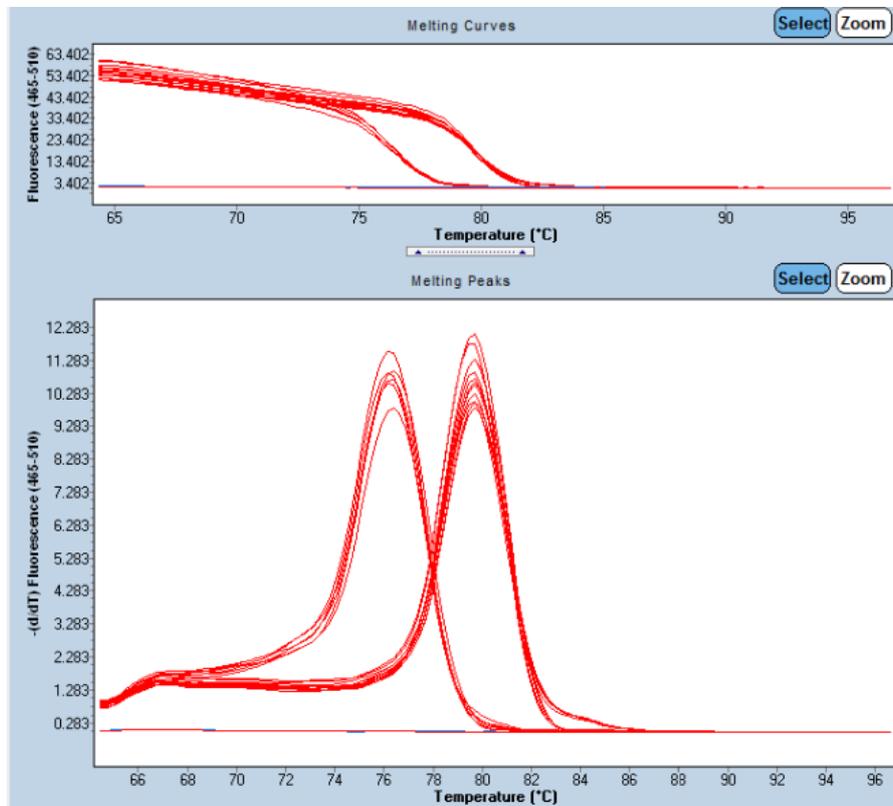
Condición 5 (0.5F-0.5R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	79.36	33.84	2.89	11.71
10 ⁷ copias RT1	79.75	32.39	2.96	10.94
10 ⁷ copias RT1	79.79	29.36	2.99	9.82
10 ⁵ copias RT1	79.77	29.37	2.95	9.96
10 ⁵ copias RT1	79.68	28.78	2.94	9.79
10 ⁵ copias RT1	79.75	29.68	2.94	10.09
10 ⁷ copias RT2	79.80	28.80	2.97	9.71
10 ⁷ copias RT2	79.78	31.13	2.96	10.50
10 ⁷ copias RT2	79.81	30.47	3.00	10.14
10 ⁵ copias RT2	79.78	29.58	2.96	9.99
10 ⁵ copias RT2	79.64	30.88	2.92	10.57
10 ⁵ copias RT2	79.73	30.12	2.95	10.22
NTC RT1	76.41	30.83	3.37	9.14
NTC RT1	76.38	32.80	3.41	9.61
NTC RT1	76.42	34.13	3.42	9.98
NTC RT2	76.18	32.57	3.62	9.00
NTC RT2	76.18	32.90	3.33	9.87
NTC RT2	76.22	29.42	3.44	8.55
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



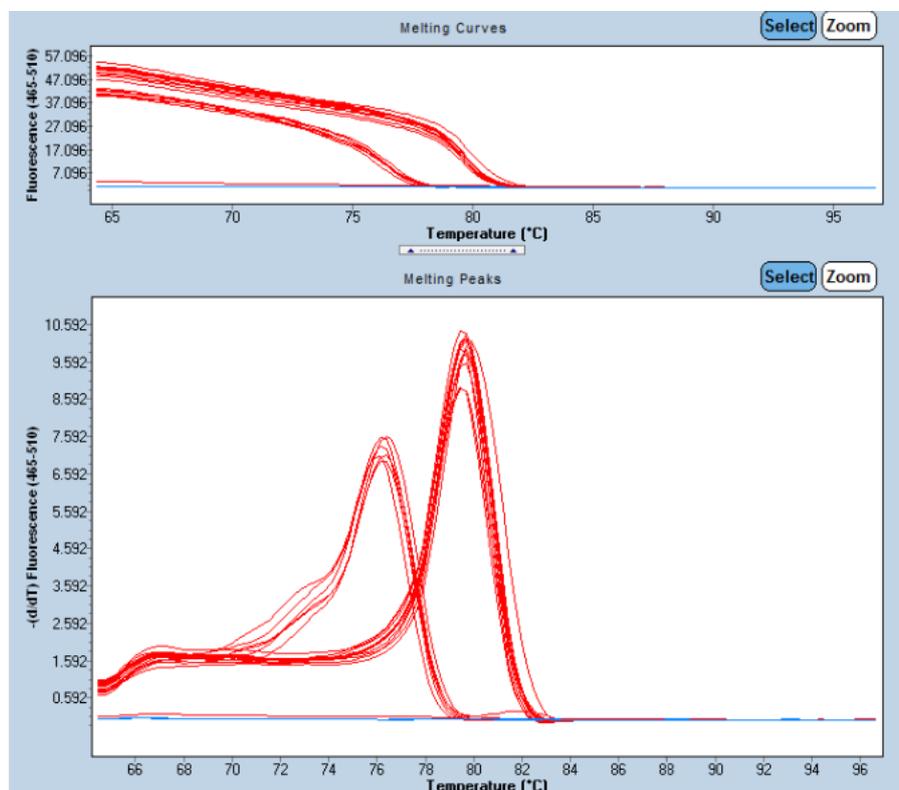
Condición 6 (0.5F-1R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	79.87	32.19	3.27	9.85
10 ⁷ copias RT1	79.77	32.35	3.22	10.06
10 ⁷ copias RT1	79.89	32.75	3.27	10.02
10 ⁵ copias RT1	79.74	33.96	3.05	11.14
10 ⁵ copias RT1	79.79	35.51	3.07	11.57
10 ⁵ copias RT1	79.82	33.37	3.08	10.82
10 ⁷ copias RT2	79.81	33.21	3.24	10.25
10 ⁷ copias RT2	79.80	34.67	3.23	10.73
10 ⁷ copias RT2	79.84	34.11	3.23	10.57
10 ⁵ copias RT2	79.67	36.41	3.03	12.01
10 ⁵ copias RT2	79.76	37.85	3.07	12.34
10 ⁵ copias RT2	79.81	35.49	3.08	11.54
NTC RT1	76.37	37.99	3.57	10.65
NTC RT1	76.41	37.24	3.43	10.85
NTC RT1	76.49	38.76	3.47	11.18
NTC RT2	76.32	38.47	3.48	11.06
NTC RT2	76.48	34.51	3.46	9.97
NTC RT2	76.35	41.01	3.50	11.73
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR	75.40	0.21	10.31	0.02



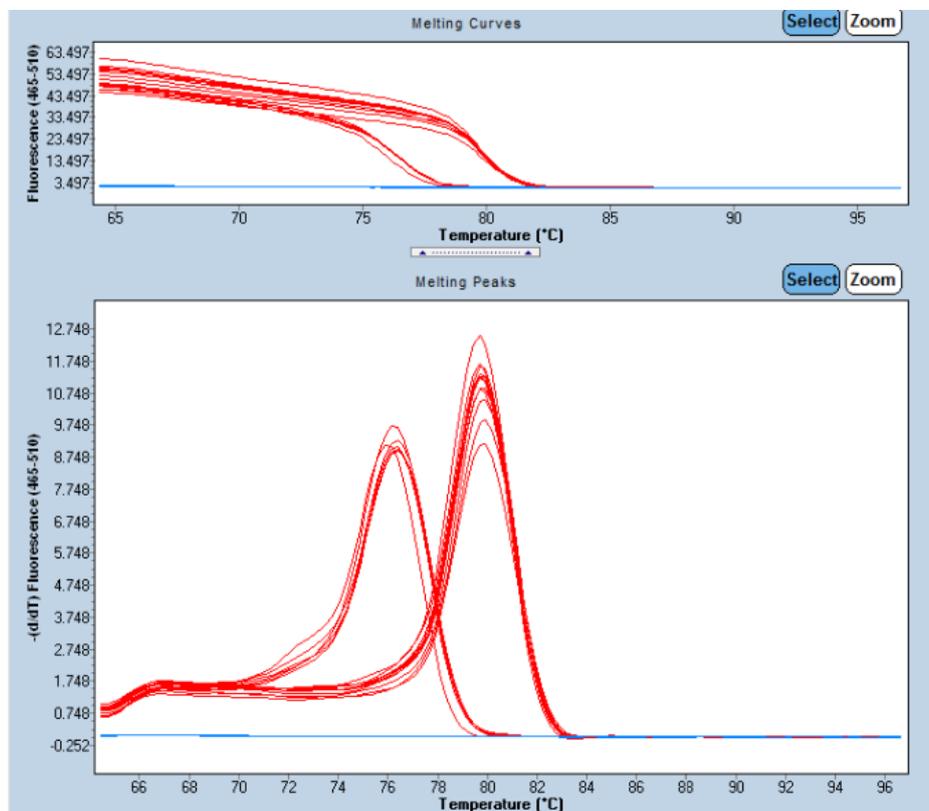
Condición 7 (1F-0.25R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	79.54	24.91	2.77	8.99
10 ⁷ copias RT1	79.68	26.88	2.79	9.65
10 ⁷ copias RT1	79.75	28.10	2.83	9.93
10 ⁵ copias RT1	79.59	29.23	2.76	10.59
10 ⁵ copias RT1	79.55	27.79	2.77	10.02
10 ⁵ copias RT1	79.77	27.15	2.70	10.04
10 ⁷ copias RT2	79.63	25.90	2.89	8.95
10 ⁷ copias RT2	79.69	28.78	2.79	10.31
10 ⁷ copias RT2	79.74	28.71	2.80	10.25
10 ⁵ copias RT2	80.02	30.47	2.95	10.33
10 ⁵ copias RT2	79.75	28.43	2.74	10.36
10 ⁵ copias RT2	79.77	28.51	2.72	10.47
NTC RT1	75.98	24.78	3.63	6.83
NTC RT1	76.37	23.84	3.38	7.06
NTC RT1	76.43	25.20	3.32	7.60
NTC RT2	76.18	25.15	3.48	7.23
NTC RT2	76.31	22.96	3.34	6.87
NTC RT2	76.23	25.69	3.45	7.46
BqPCR	82.06	0.71	2.94	0.24
BqPCR				
BqPCR				



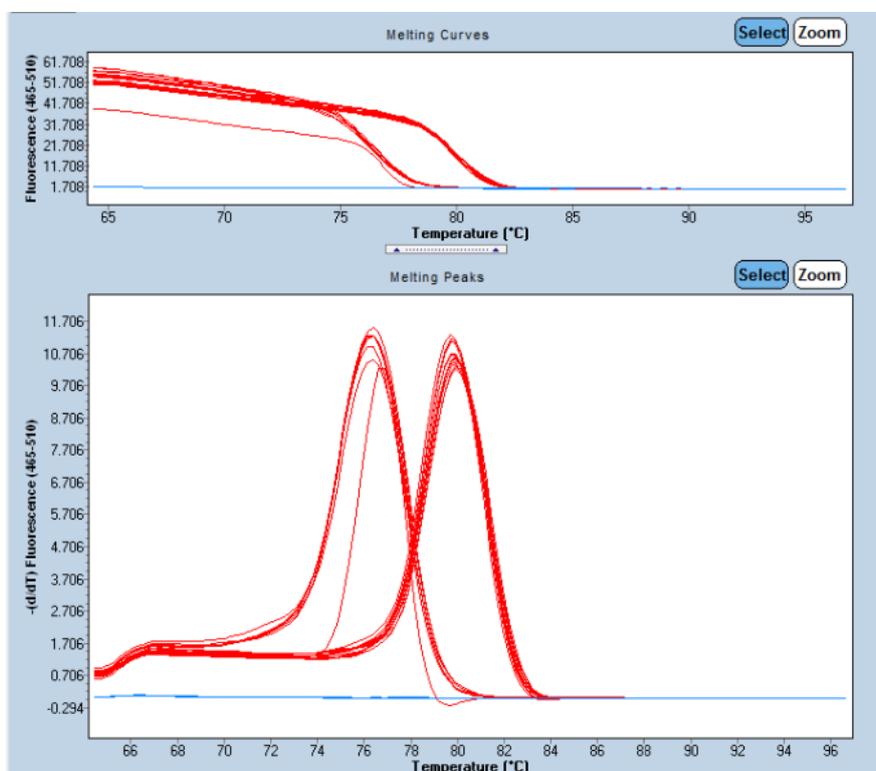
Condición 8 (1F-0.5R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	79.94	33.04	2.97	11.11
10 ⁷ copias RT1	79.93	33.88	2.95	11.49
10 ⁷ copias RT1	80.02	30.00	2.97	10.10
10 ⁵ copias RT1	79.88	32.10	2.91	11.04
10 ⁵ copias RT1	79.88	34.31	2.92	11.76
10 ⁵ copias RT1	79.95	27.37	2.93	9.36
10 ⁷ copias RT2	79.86	34.15	2.99	11.42
10 ⁷ copias RT2	79.87	33.85	2.96	11.45
10 ⁷ copias RT2	79.77	37.74	2.96	12.74
10 ⁵ copias RT2	79.79	34.48	2.92	11.79
10 ⁵ copias RT2	79.88	33.49	2.90	11.56
10 ⁵ copias RT2	79.97	31.67	2.94	10.78
NTC RT1	76.46	31.39	3.33	9.43
NTC RT1	76.40	31.59	3.46	9.12
NTC RT1	76.32	32.97	3.33	9.89
NTC RT2	76.45	30.88	3.39	9.11
NTC RT2	76.07	30.54	3.33	9.17
NTC RT2	76.44	30.64	3.39	9.03
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



Condición 9 (1F-1R)

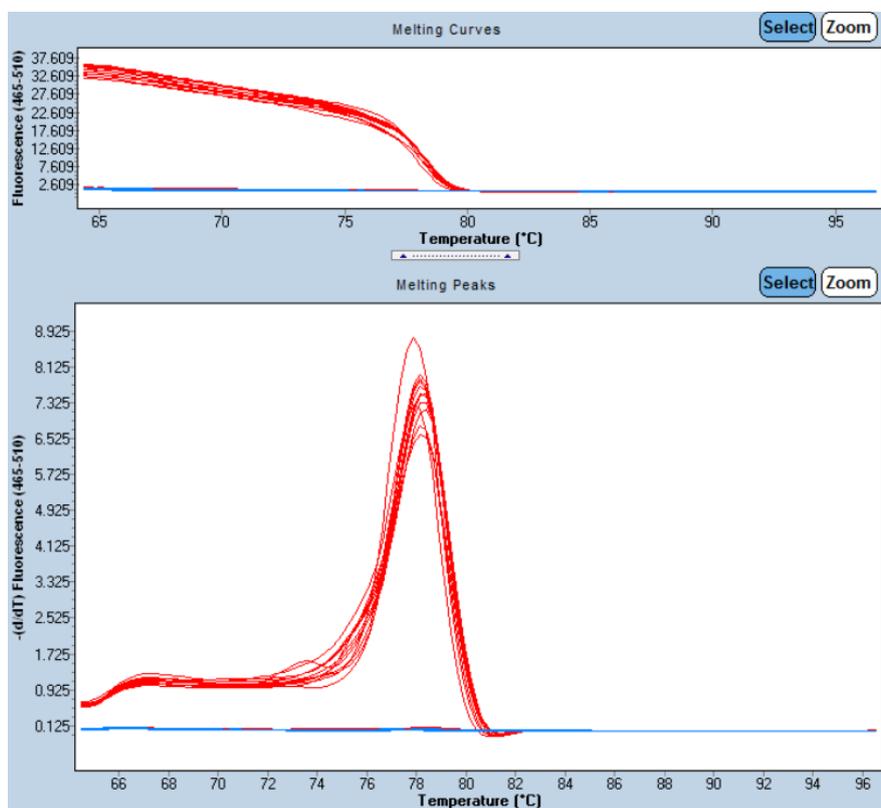
Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	80.01	32.78	3.09	10.62
10 ⁷ copias RT1	80.02	33.50	3.10	10.79
10 ⁷ copias RT1	80.10	33.12	3.16	10.49
10 ⁵ copias RT1	79.94	33.85	3.09	10.95
10 ⁵ copias RT1	79.83	35.56	3.07	11.57
10 ⁵ copias RT1	79.93	35.44	3.10	11.45
10 ⁷ copias RT2	80.05	34.20	3.15	10.87
10 ⁷ copias RT2	80.01	33.71	3.12	10.82
10 ⁷ copias RT2	80.14	33.47	3.16	10.59
10 ⁵ copias RT2	79.92	34.75	3.07	11.33
10 ⁵ copias RT2	79.98	33.05	3.08	10.74
10 ⁵ copias RT2	79.96	34.10	3.09	11.03
NTC RT1	76.42	40.59	3.52	11.53
NTC RT1	76.36	39.48	3.53	11.17
NTC RT1	76.49	41.74	3.54	11.80
NTC RT2	76.46	38.37	3.58	10.70
NTC RT2	76.46	41.03	3.56	11.54
NTC RT2	76.40	40.57	3.52	11.53
BqPCR				
BqPCR	76.83	23.10	2.21	10.47
BqPCR				



ANEXO 11. Curvas de *melting* miR-191-5p

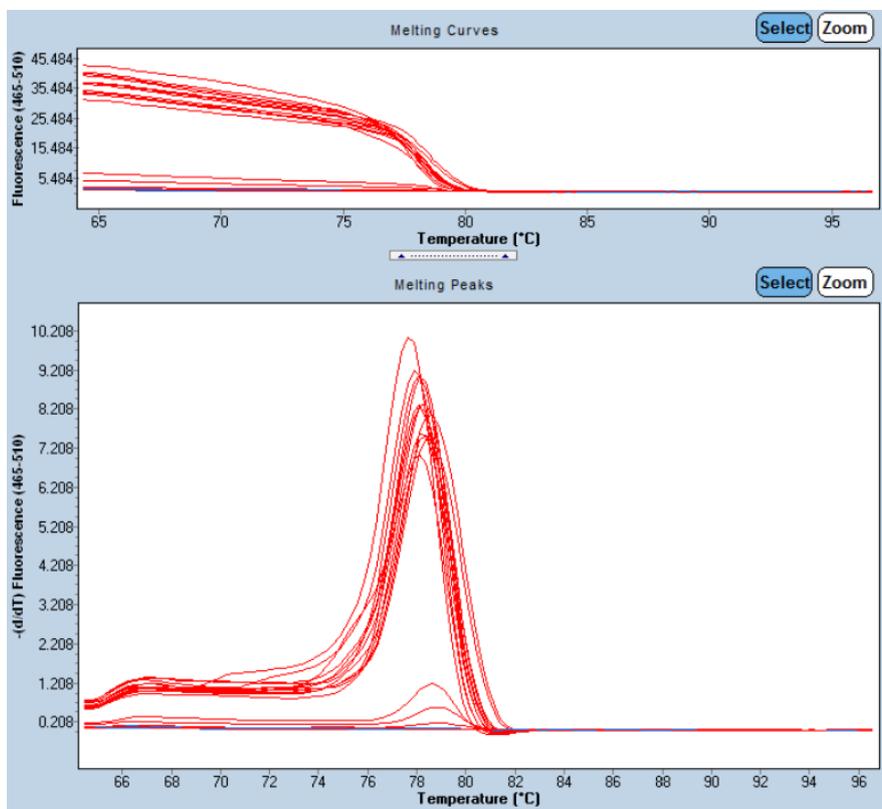
Condición 1 (0.25F-0.25R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	77.91	20.30	2.79	7.26
10 ⁷ copias RT1	78.08	22.33	2.93	7.62
10 ⁷ copias RT1	78.29	20.77	2.94	7.07
10 ⁵ copias RT1	78.15	18.92	2.75	6.87
10 ⁵ copias RT1	78.08	20.19	2.93	6.88
10 ⁵ copias RT1	77.95	22.78	2.53	9.00
10 ⁷ copias RT2	78.08	21.75	2.93	7.42
10 ⁷ copias RT2	78.25	21.68	2.93	7.39
10 ⁷ copias RT2	78.24	21.17	2.93	7.22
10 ⁵ copias RT2	78.19	20.58	2.58	7.98
10 ⁵ copias RT2	78.19	21.18	2.62	8.08
10 ⁵ copias RT2	78.21	20.70	2.60	7.97
NTC RT1				
NTC RT1	77.82	0.41	2.26	5.05
NTC RT1				
NTC RT2	79.33	0.18	2.45	0.07
NTC RT2				
NTC RT2				
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



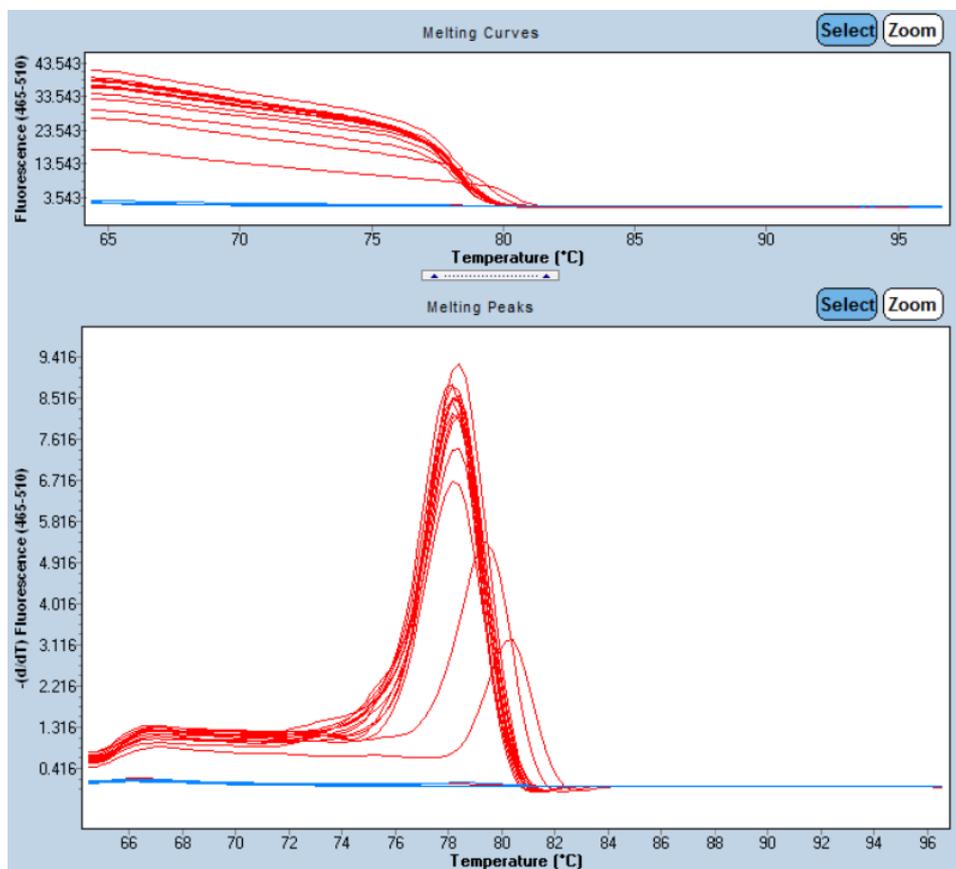
Condición 2 (0.25F-0.5R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	77.69	28.07	2.77	10.15
10 ⁷ copias RT1	77.94	25.68	2.76	9.30
10 ⁷ copias RT1	78.39	21.34	2.78	7.66
10 ⁵ copias RT1	77.97	21.53	3.08	6.99
10 ⁵ copias RT1	78.16	21.67	2.54	8.52
10 ⁵ copias RT1	78.29	20.72	2.67	7.76
10 ⁷ copias RT2	78.63	22.21	2.91	7.63
10 ⁷ copias RT2	78.68	24.32	2.94	8.28
10 ⁷ copias RT2	78.34	23.46	2.76	8.49
10 ⁵ copias RT2	78.14	24.36	2.63	9.27
10 ⁵ copias RT2	78.24	24.72	2.70	9.17
10 ⁵ copias RT2	78.21	23.28	2.78	8.38
NTC RT1	78.57	8.60	2.28	3.77
NTC RT1	78.99	1.40	2.37	0.59
NTC RT1				
NTC RT2	78.76	2.34	1.96	1.19
NTC RT2	79.36	0.36	2.16	0.17
NTC RT2				
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR	71.34	0.51	9.52	0.05



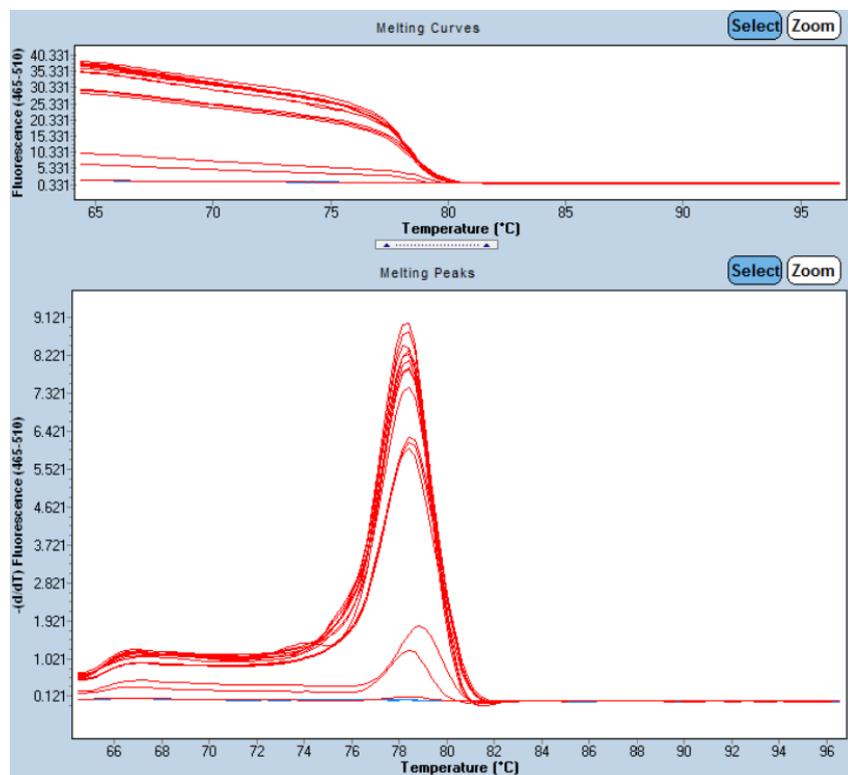
Condición 3 (0.25F-1R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	78.07	23.66	2.64	8.96
10 ⁷ copias RT1	78.32	23.96	2.76	8.69
10 ⁷ copias RT1	78.38	22.47	2.73	8.23
10 ⁵ copias RT1	78.27	20.58	2.73	7.53
10 ⁵ copias RT1	78.25	18.10	2.65	6.83
10 ⁵ copias RT1	78.25	21.77	2.61	8.34
10 ⁷ copias RT2	78.12	22.85	2.68	8.52
10 ⁷ copias RT2	78.28	23.50	2.72	8.65
10 ⁷ copias RT2	78.38	25.68	2.73	9.41
10 ⁵ copias RT2	78.21	23.36	2.73	8.57
10 ⁵ copias RT2	78.28	22.98	2.56	8.97
10 ⁵ copias RT2	78.27	22.95	2.79	8.22
NTC RT1	80.43	6.27	1.91	3.28
NTC RT1				
NTC RT1	75.14	0.72	9.72	0.07
NTC RT2	79.45	12.94	2.38	0.44
NTC RT2				
NTC RT2				
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



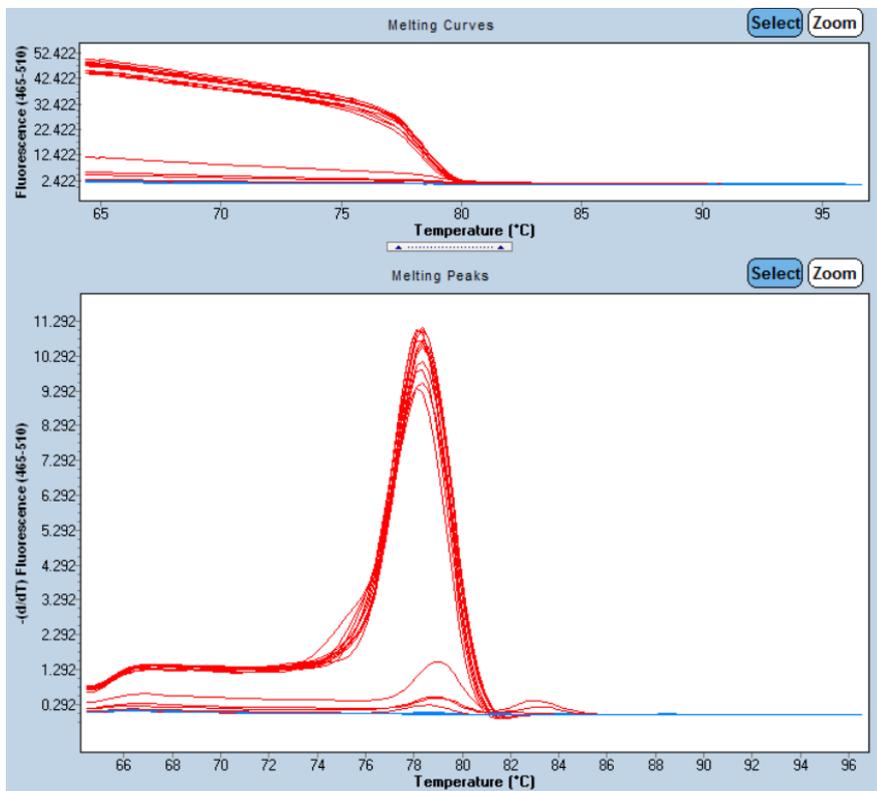
Condición 4 (0.5F-0.25R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	78.43	17.56	2.91	6.04
10 ⁷ copias RT1	78.52	18.16	2.93	6.20
10 ⁷ copias RT1	78.54	18.67	2.95	6.33
10 ⁵ copias RT1	78.36	21.22	2.58	8.22
10 ⁵ copias RT1	78.33	23.31	2.78	8.39
10 ⁵ copias RT1	78.28	25.02	2.75	9.12
10 ⁷ copias RT2	78.39	23.09	2.89	7.98
10 ⁷ copias RT2	78.37	23.01	2.90	7.93
10 ⁷ copias RT2	78.41	21.87	2.90	7.53
10 ⁵ copias RT2	78.34	23.30	2.61	8.93
10 ⁵ copias RT2	78.29	23.38	2.78	8.40
10 ⁵ copias RT2	78.22	23.54	2.76	8.54
NTC RT1	78.28	2.12	2.61	0.34
NTC RT1	78.99	3.67	2.02	1.82
NTC RT1				
NTC RT2				
NTC RT2	78.85	1.53	2.37	0.70
NTC RT2	78.9	2.71	2.10	1.29
BqPCR				
BqPCR	78.48	0.56	2.09	1.23
BqPCR	78.57	0.28	2.63	0.11



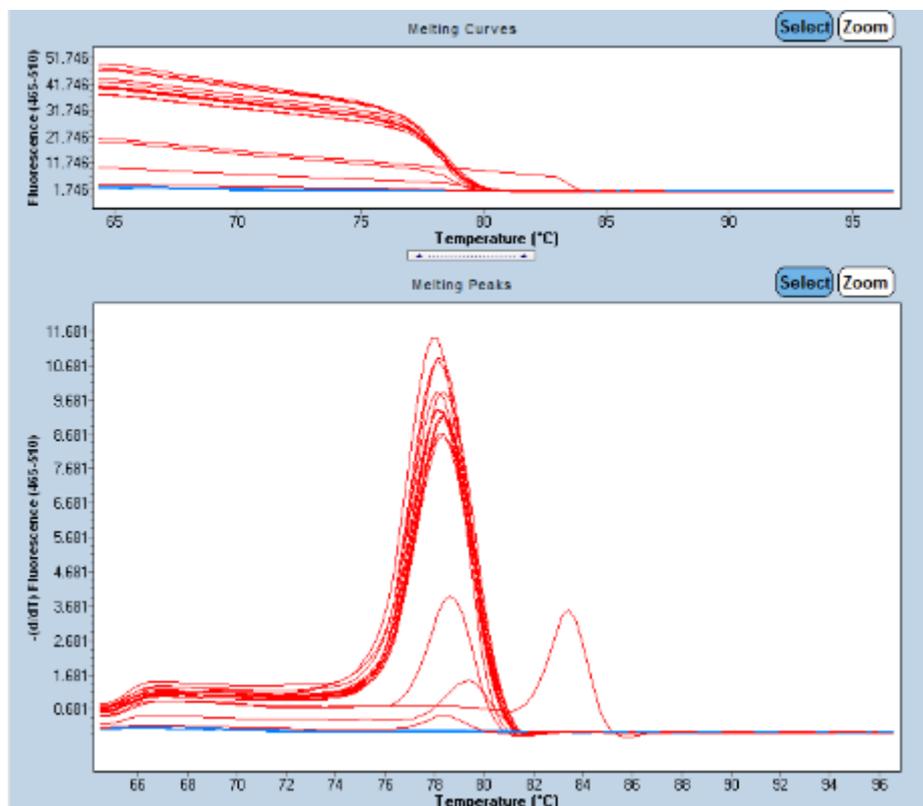
Condición 5 (0.5F-0.5R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	78.41	29.58	2.85	10.37
10 ⁷ copias RT1	78.45	30.87	2.87	10.77
10 ⁷ copias RT1	78.44	32.29	2.87	11.26
10 ⁵ copias RT1	78.29	31.60	2.87	11.01
10 ⁵ copias RT1	78.30	29.80	3.06	9.73
10 ⁵ copias RT1	78.27	29.03	2.91	9.98
10 ⁷ copias RT2	78.40	32.48	2.87	11.33
10 ⁷ copias RT2	78.46	31.49	2.88	10.95
10 ⁷ copias RT2	78.44	31.15	2.87	10.85
10 ⁵ copias RT2	78.26	31.45	2.79	11.27
10 ⁵ copias RT2	78.31	30.84	2.72	11.33
10 ⁵ copias RT2	78.14	28.44	3.02	9.41
NTC RT1	79.06	2.08	6.47	0.32
NTC RT1	78.89	1.51	2.29	1.64
NTC RT1	79.06	4.74	3.67	1.29
NTC RT2	78.87	1.72	2.43	1.53
NTC RT2	78.72	1.39	2.20	1.18
NTC RT2	79.05	1.47	2.90	0.51
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR				



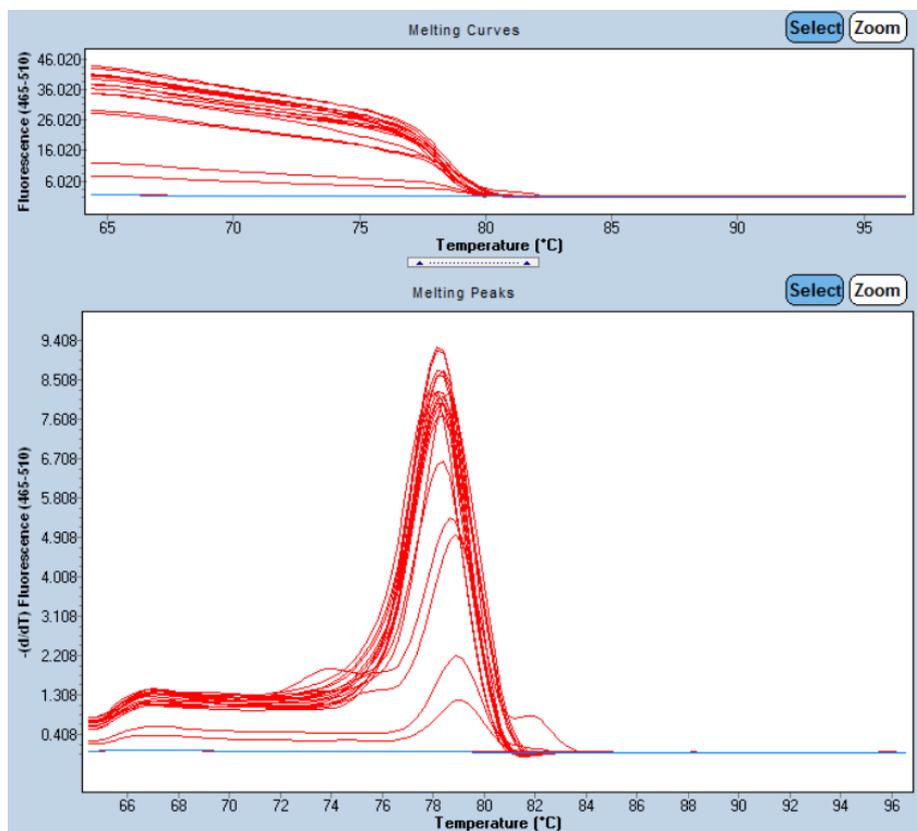
Condición 6 (0.5F-1R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	78.43	25.18	2.83	8.89
10 ⁷ copias RT1	78.41	26.83	2.85	9.43
10 ⁷ copias RT1	78.48	26.81	2.85	9.40
10 ⁵ copias RT1	78.25	28.22	2.77	10.19
10 ⁵ copias RT1	78.28	27.04	2.81	9.63
10 ⁵ copias RT1	78.35	25.27	2.84	8.90
10 ⁷ copias RT2	78.46	27.15	2.86	9.48
10 ⁷ copias RT2	78.29	31.91	2.85	11.18
10 ⁷ copias RT2	78.48	29.18	2.86	10.19
10 ⁵ copias RT2	78.07	32.17	2.73	11.77
10 ⁵ copias RT2	78.25	31.55	2.84	11.12
10 ⁵ copias RT2	78.28	27.25	2.83	9.63
NTC RT1	78.76	8.26	2.06	4.02
NTC RT1				
NTC RT1				
NTC RT2	83.54	5.92	1.78	3.32
NTC RT2				
NTC RT2	79.53	3.16	2.08	1.52
BqPCR				
BqPCR				
BqPCR	78.49	1.13	2.34	0.48



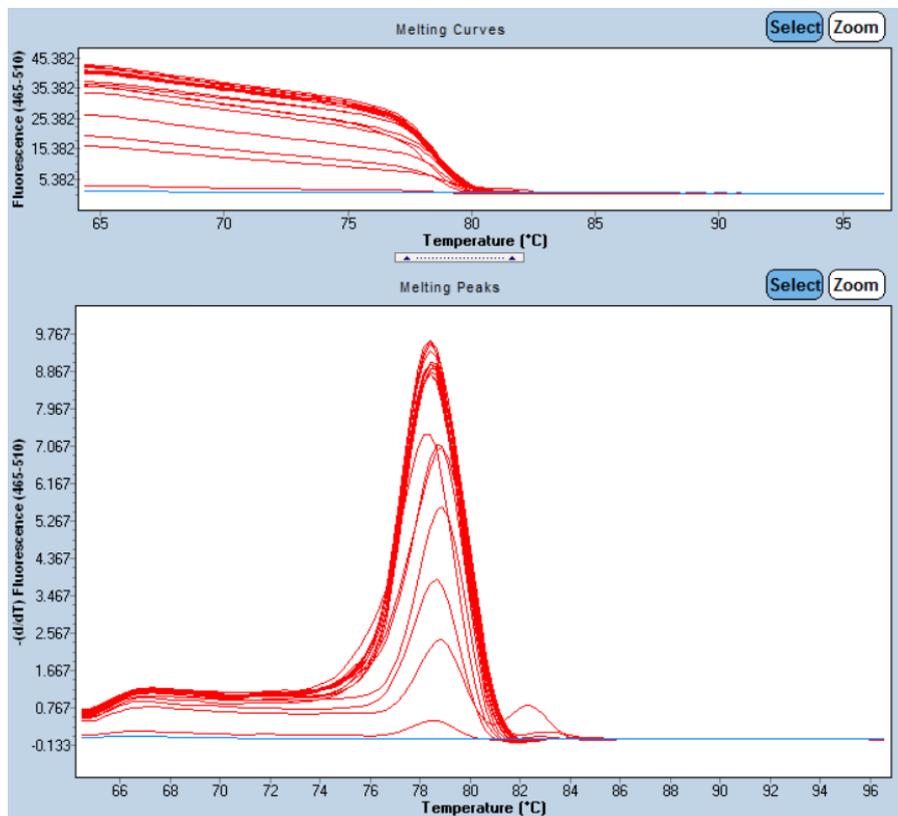
Condición 7 (1F-0.25R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	78.16	24.31	2.94	8.28
10 ⁷ copias RT1	78.42	25.09	3.06	8.21
10 ⁷ copias RT1	78.47	24.71	3.07	8.06
10 ⁵ copias RT1	78.30	22.74	2.70	8.42
10 ⁵ copias RT1	78.30	22.20	2.72	8.16
10 ⁵ copias RT1	78.33	21.60	2.77	7.81
10 ⁷ copias RT2	78.00	24.40	2.93	8.34
10 ⁷ copias RT2	78.36	27.11	3.07	8.82
10 ⁷ copias RT2	78.49	27.20	3.09	8.81
10 ⁵ copias RT2	78.26	25.51	2.70	9.45
10 ⁵ copias RT2	78.28	25.17	2.69	9.37
10 ⁵ copias RT2	78.31	23.51	2.68	8.78
NTC RT1	78.63	20.66	2.48	8.33
NTC RT1	78.74	14.54	2.70	5.39
NTC RT1	79.04	14.07	2.95	4.77
NTC RT2	78.36	17.06	2.54	6.71
NTC RT2	79.06	4.62	2.06	2.24
NTC RT2	79.22	2.46	2.06	1.19
BqPCR				
BqPCR	79.53	0.20	6.63	0.03
BqPCR				



Condición 8 (1F- 0.5R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	78.50	26.86	3.00	8.95
10 ⁷ copias RT1	78.60	27.65	3.00	9.22
10 ⁷ copias RT1	78.65	27.39	2.98	9.18
10 ⁵ copias RT1	78.59	27.56	2.97	9.27
10 ⁵ copias RT1	78.49	27.63	2.82	9.79
10 ⁵ copias RT1	78.55	25.23	2.79	9.06
10 ⁷ copias RT2	78.53	28.56	2.99	9.55
10 ⁷ copias RT2	78.57	28.48	3.08	9.24
10 ⁷ copias RT2	78.56	29.28	3.01	9.74
10 ⁵ copias RT2	78.52	27.65	3.00	9.22
10 ⁵ copias RT2	78.43	27.16	2.77	9.80
10 ⁵ copias RT2	78.50	25.36	2.82	8.99
NTC RT1	78.75	19.41	2.70	7.20
NTC RT1	78.96	7.59	3.57	2.13
NTC RT1	78.72	8.74	2.23	3.91
NTC RT2	78.84	20.91	2.94	7.12
NTC RT2	78.27	21.68	2.91	7.44
NTC RT2	78.92	13.16	2.30	5.72
BqPCR	78.64	1.06	2.28	0.47
BqPCR				
BqPCR				



Condición 9 (1F-1R)

Name	Tm1	Area1	Width1	Height1
10 ⁷ copias RT1	78.36	23.04	2.88	7.99
10 ⁷ copias RT1	78.64	28.16	2.95	9.56
10 ⁷ copias RT1	78.65	26.47	2.95	8.96
10 ⁵ copias RT1	78.45	25.14	2.87	8.75
10 ⁵ copias RT1	78.38	27.09	2.86	9.47
10 ⁵ copias RT1	78.43	26.02	2.78	8.87
10 ⁷ copias RT2	78.77	27.65	2.98	9.28
10 ⁷ copias RT2	78.64	27.27	2.95	9.25
10 ⁷ copias RT2	78.69	26.63	2.98	8.95
10 ⁵ copias RT2	78.42	25.05	2.86	8.75
10 ⁵ copias RT2	78.43	26.67	2.89	9.23
10 ⁵ copias RT2	78.57	26.59	2.96	8.99
NTC RT1	78.81/81.26	5.45/12.47	3.63/2	1.50/6.38
NTC RT1	78.73	15.95	2.86	5.58
NTC RT1	80.41	13.13	3.25	4.04
NTC RT2	83.02	14.48	2.02	7.16
NTC RT2	78.97	4.39	2.09	2.10
NTC RT2	79.22	6.41	2.37	2.71
BqPCR	78.41	1.61	2.14	0.76
BqPCR	78.24	0.62	2.56	0.43
BqPCR				

