



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**



CARRERA DE BIOLOGÍA

**“Identificar los microRNAs en tejido pleural de
pacientes con mesotelioma pleural maligno que sean
posibles biomarcadores de diagnóstico de la
enfermedad”**

TESIS

Para obtener el Título de BIÓLOGO

PRESENTA:

Luis Carlos Salinas Silva

Director de Tesis:

Dra. Blanca Ortiz Quintero

Asesor Interno:

Dra. Ma. del Carmen García Rodríguez



México, D.F.

Junio.2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Este trabajo fue desarrollado en la Unidad de Investigación,
Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de
Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas" bajo la
dirección de la Dra. Blanca Ortiz Quintero.**



DEDICADA A MIS SERES QUERIDOS:

SUSAN

MA. EVANGELINA

JOSÉ LUIS

ANGELICA

JORGE E.

NAYELI

JORGE A.

AGRADECIMIENTOS . . .

. . . A SUSAN, porque siempre estuviste y estás conmigo apoyándome incondicionalmente en todo momento (en las buenas y en las malas), por compartir tu tiempo, tu paciencia, tu amor y esa excelente persona que eres. Gracias por todas las experiencias a tu lado. Gracias por dejarme ser parte de tu vida. TE AMO!!

. . . A mis PADRES, por todo el cariño, el esfuerzo, la dedicación y el apoyo a lo largo de mi vida, por ayudarme y confiar en mi para alcanzar esta meta. Por darme las herramientas para enfrentar la vida. Y porque me enseñaron a ser una excelente persona.

. . . A mis HERMANOS por ser mi compañía, por escucharme y aconsejarme a lo largo de mi vida. Por su apoyo y consejos en toda situación. Por todos esos momentos que compartimos.

. . . A la DRA. BLANCA ORTIZ por haberme dado la oportunidad de participar en tu equipo de trabajo (GABY; VICENTE Y ERIC), por darme la confianza de ser parte del proyecto, por compartir y brindarme todos sus conocimientos, y por todo el apoyo durante todo este tiempo en que se desarrolló este proyecto para mi titulación.

. . . A la DRA. CARMEN GARCÍA por darme todo tu apoyo a lo largo de esta etapa y ayudarme conseguir este logro, porque tú me diste esa oportunidad de conocer como se hace investigación.

. . . A mis COMPIS (Miriam, Danae y Diego) por compartir todos esos momentos de aventuras, salidas a campo, intercambio de conocimientos y su apoyo, pero sobre todo por brindarme su amistad y compañía.

. . . A TODA MI FAMILIA porque siempre ha estado ahí para apoyarme, para escucharme y aconsejarme, porque directa o indirectamente siempre influyeron en mí para seguir adelante.

. . . A mis AMIGOS, a todos los que me brindaron su verdadera y sincera amistad, su apoyo y por compartir sus conocimientos, sus experiencias y consejos conmigo.

GRACIAS A TODOS POR SER PARTE DE MI VIDA

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	i
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	ii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN	7
III. HIPÓTESIS	8
IV. OBJETIVOS	9
1. Objetivo General	9
2. Objetivos Particulares	9
V. MATERIAL Y MÉTODO	10
1. Pacientes y Muestras	10
2. Reactivos	11
3. Extracción de ARN	12
3.1. Desparafinización	12
3.2. Digestión Proteolítica	12

3.3. Aislamiento de Ácidos Nucleicos	13
3.4. Digestión por Nucleasas y Purificación Final	14
4. Determinación de miRNAs	15
4.1. Transcripción Reversa (RT)	15
4.2. Preamplificación	17
4.3. Mezcla PCR	18
4.4. Cargado de las muestras en las placas TaqMan® microRNA Array (A y B)	19
4.5. Análisis de las muestras en las placas TaqMan® microRNA Array	20
5. Análisis Estadístico	20
6. Análisis Bioinformático	21
6.1. miRBase	21
6.2 TargetScan	21
6.3. miRSystem	22

VI.	RESULTADOS	23
	1. Características de las Muestras y de los Grupos de Estudio	23
	2. Detección de miRNAs mediante PCR-Array (PCR tiempo real)	26
	3. Análisis de los Blancos Predictivos de los miRNAs de interés	32
VII.	DISCUSIÓN	40
VIII.	CONCLUSIONES	43
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
X.	ANEXO	49

RESUMEN

El Mesotelioma Pleural Maligno (MPM) es un tumor agresivo que se origina en las células mesoteliales de la pleura, y en la mayoría de los casos se asocia a la exposición prolongada a fibras de asbesto. El MPM es una enfermedad difícil de diagnosticar y no presenta una buena respuesta a la terapia oncológica convencional, presentando una supervivencia de 6 a 18 meses independientemente del tratamiento aplicado. Actualmente se conoce poco acerca de las alteraciones moleculares responsables del MPM, y no existen blancos potenciales para una terapia eficiente o marcadores para métodos diagnósticos alternativos. Los microRNAs (miRNAs) son ARNs no codificantes que regulan la expresión génica de forma post-transcripcional mediante el bloqueo o eliminación de ARN mensajeros blancos. Los miRNAs regulan de forma normal procesos celulares esenciales como ciclo celular, diferenciación, proliferación, apoptosis y hematopoyesis; y su expresión aberrante ha sido asociada a la presencia de neoplasias. Esta expresión aberrante permite distinguir tejido normal (sano) de tejido tumoral, lo que los señala como posibles marcadores de diagnóstico. Para identificar marcadores potenciales de diagnóstico en el MPM, se analizaron los miRNAs de tejido pleural de paciente diagnosticados con MPM *versus* tejido normal adyacente mediante tecnología de PCR en tiempo real y un arreglo que contiene 736 miRNAs conocidos (PCR-Array). Los resultados indicaron que 20 miRNAs están expresados de forma alterada en MPM. El análisis por bioinformática reveló que tres de éstos miRNAs alterados (hsa-miR-101-3p, -181-5p, -212-3p) regulan blancos predictivos en la vía del TGF- β ; y que el hsa-miR-101-3p presenta además como blanco predictivo al ARN mensajero de la molécula Cox-2. Alteraciones en la vía de Cox2 y TGF- β han sido involucradas en la patogénesis de MPM, señalando una posible relevancia de dichos miRNAs en la patogénesis de esta enfermedad, y una mayor posibilidad de que pudieran ser utilizados como marcadores de diagnóstico.

INDICE DE ABREVIATURAS

ΔRn	Diferencia de la señal de fluorescencia
ACE	Antígeno Carcino-Embrionario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
Ber-EP4	Antígeno Epitelial
cDNA	Ácido desoxirribonucleico copia
CK	Citoqueratina
Cox2	Ciclooxygenase 2
Ct	Ciclo umbral
Ctrl	Control
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
F	Femenino
FFPE	Fijado en Formalina Embebido en Parafina
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
hsa	Primera nomenclatura asignada a miRNAs que indica <i>Homo sapiens</i> (ejemplo: hsa-miR-212)
M	Masculino
MIQE	Información Mínima para la Publicación de Experimentos PCR Cuantitativo en Tiempo Real
miR	Segunda nomenclatura asignada a miRNAs que indica microRNA Ejemplo: (ejemplo: hsa-miR-212)
miRNA	microRNA
mM	miliMolar
MPM	Mesotelioma Pleural Maligno
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marcos de Lectura Abierta

P	Valor de probabilidad
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCR-Array	Arreglo de Reacción en Cadena de la Polimerasa
PreAmp	Preamplificación
RNU6	Ácido Ribonucleico Nuclear U6
RQ	Cuantificación relativa
RT	Transcripción Reversa
RT-qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativo con Transcripción Reversa
SMAD2	SMAD family member 2
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante beta
TTF-1	Factor de Transcripción Tiroideo-1
UCSC	Universidad de California, Santa Cruz
UTR	Región No Traducida

I. INTRODUCCIÓN

El mesotelioma pleural maligno (MPM) es un tumor agresivo (Robinson *et al*, 2005; Ceresoli *et al*, 2007), que se desarrolla por la transformación de células mesoteliales en pleura (Bagheri *et al*, 2011), y en la mayoría de los casos está asociado a la exposición a fibras de asbesto (Robinson *et al*, 2005; Husain *et al*, 2009). Esta enfermedad tiene un largo periodo de latencia de 20 - 40 años (Bianchi *et al*, 2007; Ray *et al*, 2009), pero una vez que se manifiestan los síntomas suele presentar una rápida evolución con una sobrevida de 6 - 18 meses (García-López *et al*, 2000; Fernández-Infante *et al*, 2005; Kumar *et al*, 2010). La enfermedad se manifiesta con dolor torácico, derrame pleural y disnea (Robinson *et al*, 2005; Ray *et al*, 2009; Kumar *et al*, 2010; Bagheri *et al*, 2011). El 80% de los casos diagnosticados se presentan en varones con una edad mayor a 50 años (Robinson *et al*, 2005; Bagheri *et al*, 2011).

El MPM se clasifica histológicamente en 3 tipos: epiteloide, sarcomatoide y mixto o bifásico (García-López *et al*, 2000; Husain *et al*, 2009; Ray *et al*, 2009; Kumar *et al*, 2010). El tipo histológico más frecuente es el tipo epiteloide (60%) (García-López *et al*, 2000; Husain *et al*, 2009; Ray *et al*, 2009).

El diagnóstico certero del MPM es muy difícil, y se considera que existe una subestimación de los casos reales reportados a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima 92,252 muertes mundiales en el periodo 1994-2008 (Delgermaa *et al*, 2011), pero se sugiere que la cifra esta subestimada por la falta de registros confiables del diagnóstico de la enfermedad (Park *et al*, 2011). Se predice además un pico en el incremento de la incidencia mundial del mesotelioma en 10 - 20 años, basados en los periodos de alta exposición al asbesto (Robinson *et al*, 2005).

A pesar de ser considerado un padecimiento tumoral relativamente poco común, el MPM toma gran importancia debido a la gran cantidad de personas expuestas al asbesto o sus derivados, a su difícil diagnóstico, a la falta de tratamientos efectivos,

y la fatalidad de la enfermedad (McDonald *et al*, 1996; Robinson *et al*, 2005; Ray *et al*, 2009).

La dificultad del diagnóstico radica en los periodos tan largos de latencia, a que los síntomas no son específicos de la enfermedad y a la baja especificidad de los métodos diagnósticos disponibles.

Los resultados del análisis citológico de líquido pleural son con frecuencia falsos negativos, y se obtiene un diagnóstico positivo solo en el 26% de los casos.

El método diagnóstico aceptado como “estándar de oro” para el MPM consiste en el análisis inmunohistoquímico de varios marcadores tisulares en muestras de tejido pleural. Sin embargo, esto sólo se realiza después de la sospecha de la enfermedad basada en resultados radiológicos, clínicos y de antecedentes de exposición a carcinogénicos como el asbesto. La mejor muestra para el diagnóstico es la obtenida mediante toracoscopia, lo que permite obtener una muestra representativa en un 98% de los casos (Ray *et al*, 2009). Sin embargo, el diagnóstico basado en inmunohistoquímica presenta la característica de ser subjetivo, por lo que depende de la experiencia del patólogo. Aunado a lo anterior, no existe un marcador 100% específico del MPM, por lo que deben identificarse una batería de marcadores que sean positivos y además negativos en las muestras de tejido (Husain *et al*, 2009). El “Panel Internacional para el diagnóstico del Mesotelioma” recomienda que se usen por lo menos 2 marcadores positivos para el MPM (Calretinina, Citoqueratina 5/6) y 2 marcadores que sean negativos al MPM pero positivos para otros carcinomas de origen epitelial (ACE, Ber-EP4) (Husain *et al*, 2009).

Debido a lo anterior, se recomienda que el diagnóstico de MPM debe basarse en la interpretación conjunta de los resultados obtenidos del análisis inmunohistoquímico de tejido pleural, del diagnóstico clínico y radiológico (Husain *et al*, 2009).

Debido a la carencia de un método diagnóstico cuantitativo y no subjetivo del MPM, es necesario buscar herramientas diagnósticas alternativas que se sumen a las existentes. Una alternativa reciente para marcadores de diagnóstico son los microRNAs. Los miRNAs son ARNs pequeños no codificantes de ~22 nucleótidos de origen endógeno que regulan la expresión genética a nivel postranscripcional

mediante el bloqueo de la traducción o la inducción de la degradación de ARN mensajeros blanco (Carthew *et al*, 2009). Los miRNAs regulan múltiples procesos celulares esenciales como el ciclo celular, diferenciación, proliferación, apoptosis y hematopoyesis (Brennecke *et al*, 2003; Carthew *et al*, 2009), constituyendo un mecanismo general de regulación de la expresión genética.

Como se muestra en la figura 1, los miRNAs se originan en el núcleo celular como precursores llamados miRNA primarios o pri-miRNAs, que se caracterizan por presentar una longitud de 60 - 100 nucleótidos y una estructura de "hairpin o rizo". Los pri-miRNAs son procesados por el complejo proteico Drosha-DGCR8 que escinde al pri-miRNA para dar origen a otro precursor con menor tamaño denominado pre-miRNA, que tiene un tamaño de ~70 nucleótidos. El pre-miRNA es transportado por la exportin-5-RanGTP hacia el citoplasma, donde el pre-miRNA es procesado por Dicer (RNasa de tipo III) para producir el miRNA maduro de ~22 nucleótidos (Carthew *et al*, 2009). El miRNA maduro lleva a cabo su función cuando es reclutado por el complejo proteico llamado RISC o miRISC, a través de su componente proteico Argonauta (AGO) (Azuma-Mukai *et al*, 2008). Las hebras del miRNA maduro se separan y la hebra guía es retenida por el complejo RISC: en mamíferos, esta hebra guía reconoce al ARN mensajero blanco en el extremo 3' en donde presenta una secuencia parcialmente complementaria a la región semilla de la hebra guía (Lewis *et al*, 2005). Lo anterior induce que la traducción del ARN mensajero blanco sea bloqueada por medio de tres posibles mecanismos: represión de la traducción, desestabilización del ARN mensajero o la degradación del ARN mensajero (Gayosso *et al*, 2013).

Recientemente se descubrió que la expresión de los miRNAs mostraba alteraciones o expresión aberrante en enfermedades neoplásicas como cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama, entre otros (Calin *et al*, 2006; Yanaihara *et al*, 2006; Bloomston *et al*, 2007; Patnaik *et al*, 2010; Dedes *et al*, 2011; Zhou *et al*, 2012). Estas alteraciones permitían diferenciar el tejido sano del tejido tumoral y presentaban perfiles únicos de expresión que no dependían de la raza, edad o género, lo que los señala como una herramienta potencial en el diagnóstico y

pronóstico de la enfermedad (Ávila-Moreno *et al*, 2011). Más aún, se descubrió que la manipulación experimental de la expresión de dichos miRNAs producía cambios en las propiedades tumorales de las células neoplásicas (Asangani *et al*, 2008; Wu *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2009) lo cual indica que la expresión aberrante de los miRNAs puede ser asociada con mecanismos cancerígenos.

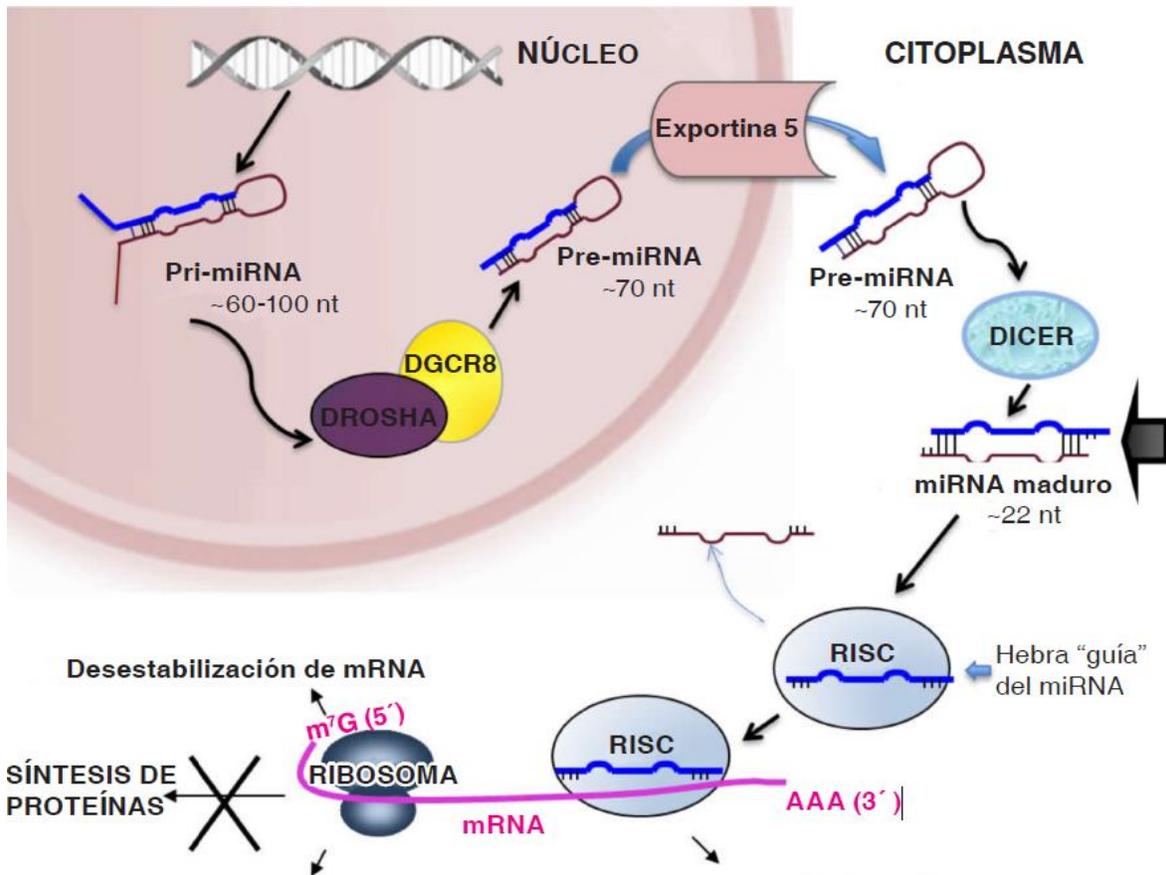


Figura 1. Esquema de la biogénesis y mecanismo de acción de miRNA (Gayosso-Gómez *et al*, 2013).

Lo anterior provee evidencia de la relevancia de los miRNAs como posibles biomarcadores de diagnóstico de enfermedades neoplásicas, e incluso como posibles blancos terapéuticos. Los miRNAs pueden además medirse cuantitativamente mediante PCR en tiempo real, lo que los señala como una herramienta útil de diagnóstico cuantitativo y una alternativa atractiva para el diagnóstico del MPM, donde se carece de un método diagnóstico no-subjetivo y cuantitativo.

Actualmente existen tres trabajos publicados donde estudiaron los miRNAs para identificar marcadores de diagnóstico de MPM *versus* controles normales. Sin embargo, dos de ellos se caracterizan por realizar la prueba de tamizaje inicial en un número limitado de líneas celulares, en lugar de tejido (Bussaca *et al*, 2010; Ivanov *et al*, 2010); y el tercer trabajo por no realizar una normalización adecuada de los datos de PCR en tiempo real (Santarelli *et al*, 2011). Busacca y colaboradores analizaron el perfil de expresión de miRNAs de dos líneas celulares de MPM (MPP-89 y REN, ambas de origen epitelial) versus una línea celular inmortalizada de mesotelio normal (HMC-TERT) como prueba de tamizaje, e intentaron trasladar sus hallazgos a lo que podría ocurrir a nivel de tejido pleural. Por su lado, Ivanov y colaboradores analizaron 8 líneas celulares de Mesotelioma y como control utilizaron 3 líneas celulares de mesotelio sano para su prueba de tamizaje. Esta estrategia de análisis presenta la desventaja de ser poco representativa de las alteraciones que podrían ocurrir a nivel de tejido. Lo anterior debido 1) al uso de un número escaso de líneas celulares y 2) a que las condiciones de cultivo particulares de cada laboratorio y el número de pases podrían favorecer cambios en la fisiología celular que podrían alterar la expresión original de miRNAs en dichas células.

Por otro lado, el estudio realizado por Santarelli y colaboradores reportó un análisis de expresión de 88 miRNAs (asociados a procesos neoplásicos en general) en 1 muestra de tejido mesotelial sano proveniente de 5 individuos (mezcla) y 10 muestras independientes de tejido diagnosticado con MPM, mediante PCR en tiempo real. Además de utilizar una sola mezcla de muestras control, los autores usaron el RNU6 como normalizador de los datos del PCR en tiempo real, sin proveer una justificación experimental de la selección de este ARN nuclear. Se ha reportado que el RNU6 no es un normalizador adecuado para muestras clínicas (Mestdagh *et al*, 2009) y que el usar normalizadores poco estables como los ARN nucleares puede provocar pérdida de datos cualitativos y cuantitativos en la determinación diferencial de miRNAs.

Ambas desventajas metodológicas podrían inducir la pérdida de información valiosa

durante el análisis, por lo que se recomienda que una prueba de tamizaje se realice en muestras de tejido y que los datos de PCR en tiempo real sean normalizados adecuadamente.

Debido a la dificultad del diagnóstico del MPM y a la carencia de un método alternativo objetivo y cuantitativo, en este trabajo se propone identificar miRNAs con valor potencial de marcadores de diagnóstico, mediante PCR en tiempo real. Para ello se realizó una prueba de tamizaje inicial donde se analizaron 736 miRNAs totales en tejido pleural de pacientes diagnosticados con MPM tipo epitelioide (n=5) y se compararon con los miRNAs expresados en tejido sano adyacente (n=5) mediante la técnica conocida como PCR-Array. Se identificaron los miRNAs con niveles de expresión alterados o aberrantes en el MPM, para señalar a los potenciales marcadores de diagnóstico de la enfermedad. Se realizó además el análisis bioinformático de los blancos predictivos de dichos miRNAs alterados y las vías celulares donde participan, para determinar la posible relevancia biológica de los miRNAs alterados en los mecanismos de patogénesis asociados al MPM.

II. JUSTIFICACIÓN

Debido a la dificultad del diagnóstico del MPM y a la carencia de un método alternativo objetivo y cuantitativo, en este trabajo se propone identificar miRNAs con valor potencial de marcadores de diagnóstico, mediante PCR en tiempo real.

III. HIPÓTESIS

Se ha planteado que en el tejido pleural de pacientes con Mesotelioma Pleural Maligno pueden existir niveles alterados de miRNAs que son específicos de la presencia de la enfermedad, por lo que se espera poder asociar los miRNAs identificados en tejidos obtenidos de pacientes diagnosticados con mesotelioma para ser utilizados como posibles biomarcadores de diagnóstico de esta enfermedad.

IV. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Identificar los miRNAs expresados en tejido pleural de pacientes diagnosticados con Mesotelioma Pleural Maligno (subtipo epiteloide) que pudieran ser utilizados como biomarcadores potenciales de diagnóstico de la enfermedad.

2. Objetivos Particulares

- 1) Analizar el perfil de expresión de miRNAs presentes en tejido pleural conservado en parafina proveniente de pacientes diagnosticados con Mesotelioma Pleural Maligno y en tejido sano adyacente como control, mediante la prueba de tamizaje por PCR-Array.
- 2) Identificar los miRNAs en MPM cuyos niveles de expresión se encuentren alterados en comparación con los miRNAs expresados en tejido sano adyacente (sobre-expresados o sub-expresados), mediante el empleo de métodos estadísticos correspondientes.
- 3) Realizar el análisis bioinformático de los blancos predictivos y vías de señalización celular de los miRNAs identificados anteriormente, para determinar la posible relevancia biológica en el MPM.

V. MATERIAL Y MÉTODO

1. Pacientes y Muestras

Se utilizaron muestras de tejido pleural conservadas en parafina (FFPE) obtenidas del Servicio de Patología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), provenientes del año 2009 y 2010. Las muestras obtenidas se dividieron en dos grupos de estudio: 1) Grupo de estudio de "Mesotelioma pleural maligno" o MPM y 2) Grupo de estudio "Control".

1) El grupo de estudio MPM corresponde a muestras con diagnóstico histopatológico por inmunohistoquímica de Mesotelioma Pleural Maligno (MPM) subtipo epiteloide. El diagnóstico histopatológico de MPM se realizó mediante la técnica de inmunohistoquímica utilizando al menos 4 marcadores tisulares: Citoqueratina 5/6 (CK 5/6), Calretinina, Factor de Transcripción Tiroideo 1 (TTF-1) y Antígeno Carcino-Embrionario (ACE).

- **Criterios de Inclusión:** las muestras con diagnóstico clínico, radiológico e histopatológico confirmado de MPM. No presenten tratamiento oncológico previo a la toma de la muestra. Ambos géneros, mayores de 35 años.
- **Criterios de Exclusión:** las muestras cuyos diagnósticos clínico, radiológico e histopatológico no coincidan. Que presenten tratamiento oncológico previo a la toma de la muestra. Los datos clínicos recolectados del expediente del paciente no existan o estén incompletos. Infecciones al momento de la toma de la muestras. Enfermedad oncológica o pulmonar asociada.

2) El grupo de estudio "Control (Ctrl)" corresponde a tejido sano adyacente de pacientes independientes diagnosticados con paquipleuritis. La ausencia de células neoplásicas y características inflamatorias fue verificada por el patólogo.

- **Criterios de Inclusión:** las muestras con verificación histológica confirmada de Tejido Sano. Ambos géneros, mayores de 35 años.
- **Criterios de Exclusión:** que presenten tratamiento oncológico previo a la toma de la muestra. Infecciones al momento de la toma de la muestras. Enfermedad oncológica o pulmonar asociada.

El número de muestras para realizar este estudio correspondieron:

- 5 Muestras con diagnóstico de Mesotelioma Pleural Maligno (MPM).
- 5 Muestras confirmada de Tejido Sano Adyacente (Ctrl).

Las muestras utilizadas fueron macro-disectadas para asegurar que el contenido fuera >90% de células cancerosas en el tejido para el grupo MPM. Los datos clínicos se obtuvieron retrospectivamente e incluyeron información sobre género, edad, síntomas clínicos, exámenes radiológicos, exposición a asbestos, condición de fumador de tabaco y presencia de derrame pleural.

2. Reactivos

- ❖ Para la obtención de ARN: RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Ambion®), CAT. # AM1975.
- ❖ Para la reacción de transcripción reversa: TaqMan® microRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems®) CAT. # 4366596. Megaplex™ RT Primers, Human Pool A v2.1 (Applied Biosystems®) CAT. # 4399966. Megaplex™ RT Primers, Human Pool B v3.0 (Applied Biosystems®) CAT. # 4444281.
- ❖ Para la reacción de pre-amplificación: TaqMan® PreAmp Master Mix (Applied Biosystems®) CAT. # 4391128. Megaplex™ PreAmp Primers, Human Pool A v2.1 (Applied Biosystems®) CAT. # 4399233. Megaplex™

PreAmp Primers, Human Pool B v3.0 (Applied Biosystems®) CAT. # 4444303.

- ❖ Para la reacción de PCR en tiempo real: TaqMan® Universal PCR Master Mix, no AmpErase® UNG (Applied Biosystems®) CAT. # 4324018. Taqman® Array Human MicroRNA A Cards v2.0 (Applied Biosystems®) CAT. # 4398965. Taqman® Array Human MicroRNA B Cards v3.0 (Applied Biosystems®) CAT. # 4444910.

3. Extracción de ARN

Se utilizó el kit de extracción de ARN "RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE", siguiendo los pasos descritos a continuación.

3.1. Desparafinización

- Se usaron cortes de 20 µm (con un área total de 25 - 120 mm²) de muestras de tejido tumoral (MPM) y sano adyacente de pleura, y se colocaron en un tubo eppendorf.
- Se agregó 1 ml de xileno al 100%, se mezcló manualmente e incubó las muestras por 3 minutos a 50°C, posteriormente se centrifugó por 2 minutos a 10,000 rpm, se desechó el xileno con pipeta sin tocar el pellet.
- Posteriormente se añadió 1 ml de etanol al 100% y se mezclaron para lavar el pellet, se centrifugaron por 2 minutos a 10,000 rpm y se desechó el etanol cuidando de no tocar el pellet (este lavado se realiza 2 veces); se dejó secar por 20 - 30 minutos a temperatura ambiente.

3.2. Digestión Proteolítica

- Se preparó para cada muestra por separado la mezcla de digestión:

Componentes de la Mezcla de Digestión	Volumen por muestra (μL)
Digestion Buffer	200
Protease	4
Total	204

- Se agregó la mezcla de digestión e incubaron las muestras por 15 minutos a 50°C y por 15 minutos a 80°C en un bloque de calor (sin que exceda el tiempo establecido).

3.3. Aislamiento de Ácidos Nucleicos

- Se preparó por separado la siguiente mezcla aditivo/etanol: 240 μL de aditivo de aislamiento con 550 μL de etanol al 100% para un total de 790 μL de aditivo/etanol por muestra, se agregó al producto de la digestión proteolítica y se mezcló por pipeteo:

Componentes de la Mezcla Aditivo/Etanol	Volumen por muestra (μL)
Isolation Aditive	240
Etanol 100%	550
Total	790

- Se pasaron las muestras por columnas (filtros Cartridge) en tubos estériles, se colocaron 700 μL en la columna y se centrifugaron a 10,000 rpm por 30

segundos, se eliminó la mezcla filtrada y se repitió hasta filtrar toda la muestra.

- Se agregaron a la columna 700 μL de buffer wash 1, se centrifugó a 10,000 rpm por 30 segundos para lavar el filtrado en la columna y se desechó el buffer filtrado.
- Se agregó a la columna 500 μL de buffer wash 2/3, se centrifugó a 10,000 rpm por 30 segundos para lavar el filtrado de la columna y se desechó el buffer filtrado.
- Se conservó la columna y se realizó una centrifugación adicional a 10,000 rpm por 30 segundos para eliminar todo el líquido que haya quedado retenido en la columna.

3.4. Digestión por Nucleasas y Purificación Final

- Se preparó la mezcla de nucleasas por separado:

Componentes de la Mezcla de Nucleasas	Volumen por muestra (μL)
10X DNase Buffer	6
Agua libre de Nucleasas	50
DNase	4
Total	60

- Se agregó la mezcla a nuestra columna en el centro e incubó por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se agregó 700 μL de buffer wash 1 a la columna e incubó por 30 segundos a temperatura ambiente, se centrifugó a 10,000 rpm por 30 segundos y se desechó el buffer filtrado.

- Se agregó 500 µL de buffer wash 2/3 a la columna, se centrifugó a 10,000 rpm por 30 segundos y se desechó el buffer filtrado.
- Se repitió el lavado de la columna con 500 µL de buffer wash 2/3, se centrifugó a 10,000 rpm por 1 minuto y se eliminó el buffer filtrado.
- Se cambió la columna a un tubo nuevo, se agregó 40 µL de agua libre de RNAsa al centro del filtro en dos partes, primero 20 µL y se centrifugó por 1 minuto a máxima velocidad, posteriormente se agregaron los 20 µL restantes a la columna y se centrifugó por 1 minuto a máxima velocidad.
- El producto final (ARN total) se cuantificó en "Qubit 2.0 Fluorometer" (Invitrogen) y se almacenó a una temperatura de -20°C.

4. Determinación de miRNAs mediante PCR-Array

La determinación cuantitativa del perfil global de miRNAs expresados en tejido pleural de MPM y tejido sano adyacente se realizó mediante la técnica de PCR en tiempo real con reacción de transcripción reversa (RT-qPCR-Array) *TaqMan Array Human MicroRNA Panel v2.0* (Applied Biosystems, CA, USA). Este "Array" consiste de dos placas de 384 pozos (placa A y placa B) que contienen 377 sondas para miRNAs maduros y cuatro controles endógenos (placa A), y 290 sondas para miRNA maduros con siete controles endógenos (placa B). Se realizó la determinación de miRNAs mediante los reactivos y kits correspondientes para cada reacción, siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo consistió en los pasos descritos a continuación:

4.1. Transcripción Reversa (RT)

- Se descongelaron los reactivos y las muestras de ARN total en hielo.
- Se preparó una mezcla por separado para la reacción (para cada muestra) con los siguientes reactivos y cantidades:

Componentes de la Mezcla para la Reacción RT	Volumen por muestra (µL)
Agua libre de nucleasas	0.20
10X RT Buffer	0.80
MgCl ₂ (25 mM)	0.90
dNTPs with dTTP (100mM)	0.20
RNase Inhibitor (20 U/µL)	0.10
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µL)	1.50
Megaplex RT Primers A o B (10X)	0.80
Total	4.50

- Se mezclaron invirtiendo los tubos (A y B).
- Se agregó a cada tubo (tubo A y tubo B, por muestra) de mezcla de la reacción RT, 3 µL de ARN total de cada muestra con una concentración de 25 ng/µL, para un volumen final de 7.5 µL en cada tubo (tubo A y tubo B).
- Posteriormente, se realizó la reacción en un Termociclador bajo los siguientes parámetros:
 - Volumen de reacción: 7.5 µL.
 - Condiciones del termociclador:

Fase	Temperatura	Tiempo
Ciclado (40 Ciclos)	16°C	2 min
	42°C	1 min
	50°C	1 seg
Hold	85°C	5 min
Hold	4°C	∞

- Los productos de la RT (cDNA o ADN copia) se pueden almacenar a una temperatura de -20°C.

4.2. Preamplificación

- Se descongelaron las muestras de cDNA y los reactivos en hielo.
- Se realizó la mezcla con los reactivos como sigue:

Componentes de la Mezcla para Reacción de PreAmp	Volumen por muestra (µL)
Agua Libre de Nucleasas	7.5
Taqman PreAmp Master Mix (2X)	12.5
Megaplex PreAmp Primers (10X)(Pool A y B)	2.5
Total	22.5

- Se homogeneizó la mezcla por pipeteo.

- Se agregaron 2.5 μL de cDNA (por muestra) a la mezcla correspondiente a cada tubo (tubo A y tubo B), se mezcló por pipeteo, para un volumen final de 25 μL .
- Se centrifugó brevemente para mandar al fondo del tubo toda la mezcla.
- Se incubó en hielo por 5 minutos.
- Se llevó a cabo la reacción en un Termociclador con los siguientes parámetros:
 - Volumen final: 25 μL
 - Condiciones del termociclador:

Fase	Temperatura	Tiempo
Hold	95°C	10 min
Hold	55°C	2 min
Hold	72°C	2 min
Ciclado (12 Ciclos)	95°C	15 seg
	60°C	4 min
Hold	99.9°C	10 min
Hold	4°C	∞

- Finalmente, se diluyó el producto de la Preamplificación 1:4 (agregar 75 μL) con agua libre de nucleasas, homogeneizando la muestra.
- Las muestras pueden ser almacenadas a -20°C.

4.3. Mezcla PCR

- Se descongelaron los componentes de la mezcla y las muestras en hielo.

- Se realizó la mezcla en tubos de 1.5ml con los siguientes volúmenes para cada muestra (A y B):

Componentes de la Reacción de PCR	Volumen por Muestra (µL)
Agua libre de nucleasas	441
TaqMan Universal Master Mix, No AmpErase UNG, 2X	450
Producto de PreAmp diluido	9
Total	900

- Se homogeneizó la mezcla por pipeteo; posteriormente, se comenzó con la carga de las placas TaqMan® microRNA Array (Arreglo de microRNA TaqMan®).

4.4. Cargado de las muestras en las placas TaqMan® microRNA Array (A y B)

- Teniendo las mezclas de reacción de PCR listas de cada muestra (A y B), se comenzó con la carga de las placas, se agregó a cada placa 800 µL en los depósitos de llenado la mezcla correspondiente (100 µL por depósito, 8 en total).
- Posteriormente, se centrifugaron a 1200 rpm por 1 minuto, con la finalidad de que la muestra se irrigue en todos los pozos de cada depósito.
- Se sellaron las placas, con la finalidad de aislar la muestra en los pozos, se colocó el carro en la posición inicial, se insertó la placa haciendo que coincidan las perforaciones en la placa con los clips del carro y se deslizó el carro.

- Con las placas selladas se recortaron los depósitos de llenado; listos para ingresar en el equipo “7900HT Fast Real-Time PCR” (Applied Biosystems).

4.5. Análisis de las muestras en las placas TaqMan® microRNA Array

Las placas fueron analizadas en el equipo “7900HT Fast Real-Time PCR” (Applied Biosystems). Los datos crudos provenientes del aparato fueron colectados y procesados mediante el *Sequence Detection System version 2.3* (SDS software, Applied Biosystems). Los datos crudos de Cq (Cuantificación de ciclos) se calcularon mediante el SDS software aplicando los valores estándar automáticos del aparato. Sólo los miRNAs que presentaron un valor crudo de Cq mayor de 35 fue considerado como detectables. La cuantificación relativa (Rq) de cada miRNA se calculó mediante la ecuación $2^{-\Delta Cq}$, donde $\Delta Cq = Cq_{\text{media global}} - Cq_{\text{miRNA problema}}$, y el valor de cambio se calculó mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, donde $\Delta\Delta CT = [Cq_{\text{media global (MPM)}} - Cq_{\text{miRNA of interest (MPM)}}] - [Cq_{\text{media global (NORMAL Ctrl)}} - Cq_{\text{miRNA problema (NORMAL Ctrl)}}]$. El valor de la media global de la expresión (medida por Cq) se utilizó como factor normalizador de los datos del PCR en tiempo real (Mestdagh *et al*, 2009).

5. Análisis Estadístico

La expresión diferencial de los miRNAs en MPM comparado con controles sanos fue analizada mediante el método de t-student, usando el software “Expression Suite v1.0” (Life Technologies). Se consideró que un miRNA se expresaba de forma diferencial o alterada con respecto a los controles (sobre-expresión o sub-expresión) cuando la P val ≤ 0.05 and y el valor de cambio > 2 .

Para verificar la homogeneidad de las muestras intragrupal se utilizó el “coeficiente de correlación de Pearson”, el cual es una medida de la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas. El coeficiente de correlación de Pearson es el índice

que puede utilizarse para medir el grado de relación de dos variables siempre y cuando ambas sean cuantitativas. Para interpretar el coeficiente se utiliza la siguiente escala: 0 = Correlación nula, 0,01 a 0,19 = Correlación positiva muy baja, 0,2 a 0,39 = Correlación positiva baja, 0,4 a 0,69 = Correlación positiva moderada, 0,7 a 0,89 = Correlación positiva alta, 0,9 a 0,99 = Correlación positiva muy alta, 1 = Correlación positiva perfecta.

6. Análisis Bioinformática

Para el análisis bioinformático se utilizaron el software: miRBase, TargetScan y miRSystem.

6.1. “miRBase” (<http://www.mirbase.org/>).

La base de datos “miRBase” es el reservorio central de las secuencias de los miRNAs identificados en todas las especies estudiadas. Es además una fuente de herramientas para el análisis bioinformático de los blancos predictivos de los miRNAs y de información publicada de blancos moleculares y función de los mismos.

6.2. “TargetScan” (www.targetscan.org/).

TargetScan es una herramienta de bioinformática que utiliza algoritmos para la predicción de los blancos moleculares de los miRNAs, mediante la identificación de sitios de reconocimiento conservados en el ARNm conocidos como 7mer. TargetScan predice dos tipos de sitios 7mer: a) 7mer-m8, que requiere de una coincidencia exacta de las posiciones 2 – 8 del miRNA maduro (posición 8 en la secuencia semilla); y b) 7mer-1A, que requiere una coincidencia exacta de las posiciones 2 – 7 del miRNA maduro y 8mer.

6.3. “miRSystem” (<http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/>)

Los análisis de enriquecimiento de vías y genes se llevaron a cabo utilizando el miRSystem, un Sistema Integrado para Caracterizar Vías y Funciones enriquecidas de Blancos de microRNAs (<http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/>). Utilizando este sistema, los microRNAs examinados primero se convierten a la anotación más reciente de miRBase, después se aplican varios métodos estadísticos para calcular las proporciones O/E (Observado/Esperado) de genes blanco, los valores “P” hipergeométricos y los valores “P” empíricos debidos a la permutación con el fin de identificar vías de señalización significativamente enriquecidas. El registro de la base de datos miRBase se utilizó para acceder a toda la información registrada disponible con respecto a los miRNAs reportados previamente (<http://www.mirbase.org/>).

VI. RESULTADOS

1. Características de las muestras y de los Grupos de Estudio

Se utilizaron 5 muestras provenientes de pacientes con diagnóstico histopatológico, clínico y radiológico de Mesotelioma Pleural Maligno (MPM) subtipo epiteloide (Tabla 1). Cuatro pacientes fueron diagnosticados con MPM estadio III, y uno sin estadio reportado. Tres pacientes fueron del género femenino y de dos de género masculino, con un rango de edad de 49-68 años (55.2 ± 6.8 años). Cuatro de los pacientes presentaron derrame pleural. Solo dos pacientes expresaron una exposición al asbesto, sin embargo, esta información debe tomarse con cuidado ya que se recopiló del archivo clínico de los pacientes, el cual no constituye un interrogatorio estandarizado. Tres de ellos reportaron ser fumadores y únicamente uno informo que tuvo exposición a humo de leña.

El Grupo Control (Ctrl) se formó por 5 muestras independientes de tejido normal sano adyacente de pacientes diagnosticados con paquipleuritis (Tabla 2). Cuatro de las muestras provienen de pacientes de género femenino y una de género masculino; tres de ellas con un rango de edad de 51-71 años y dos de ellas de paciente de 1 año. Cuatro pacientes fueron no fumadores y uno no reportado, cuatro sin exposición a asbesto y uno no reportado, y cuatro de ellos con exposición a humo de leña y uno sin reporte. El diagnóstico de todas las muestras de los Grupos MPM y Control fue verificado por segunda vez por un patólogo independiente.

Se obtuvo un rendimiento de ARN total de 25.4 - 184.8 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ por muestra en un volumen final de 30 μL para la detección de miRNAs mediante el PCR-Array.

TABLA 1. Datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes con MPM.

CLAVE	EDAD (AÑOS)	GÉNERO (F/M)	FUMADOR (SI/NO)	EXPOSICIÓN A ASBESTO	DERRAME PLEURAL	EXPOSICIÓN A HUMO DE LEÑA	HISTOTIPO	ESTADIO	DIAGNOSTICO FINAL (PATOLOGICO +CLINICO)
MPM-1	53	F	SI	SI	SI	NO	EPITELIOIDE	III	MPM
MPM-2	49	F	NO	NO	SI	NO	EPITELIOIDE	III	MPM
MPM-3	68	M	SI	NO	SI	NO	EPITELIOIDE	III-B	MPM
MPM-4	50	F	NO	NO	NO	SI	EPITELIOIDE	NO REPORTADO	MPM
MPM-5	56	M	SI	SI	SI	NO	EPITELIOIDE	III-A	MPM

MPM = Mesotelioma Pleural Maligno.

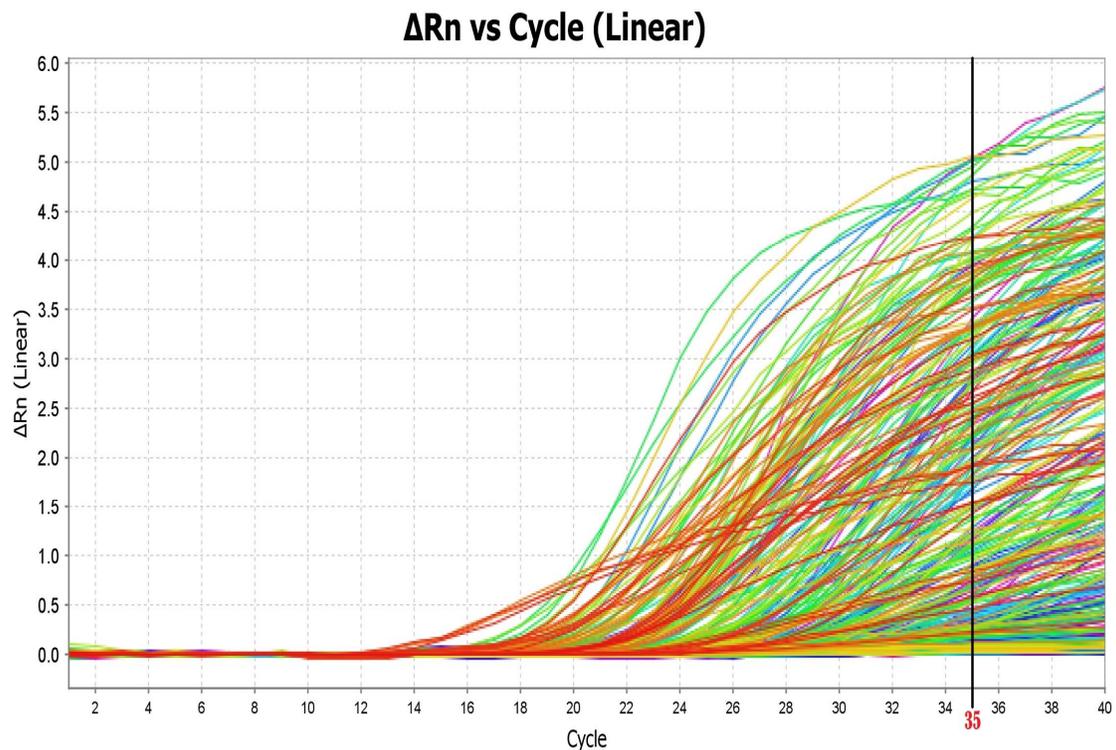
TABLA 2. Datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes con muestras Control.

CLAVE	EDAD (AÑOS)	GÉNERO (F/M)	FUMADOR (SI/NO)	EXPOSICIÓN A ASBESTO	ESPOSICIÓN A HUMO DE LEÑA	DIAGNOSTICO FINAL
Ctrl-1	71	F	NO	NO	SI	TEJIDO SANO
Ctrl-2	51	F	NO	NO	SI	TEJIDO SANO
Ctrl-3	1	F	NO	NO	SI	TEJIDO SANO
Ctrl-4	1	F	NO	NO	SI	TEJIDO SANO
Ctrl-5	53	M	NO REPORTADO	NO REPORTADO	NO REPORTADO	TEJIDO SANO

Ctrl = Control

2. Detección de miRNAs mediante PCR-Array (PCR tiempo real)

Las placas A y B contienen 736 miRNAs totales, de los cuales 554 fueron detectados en las muestras de MPM y 535 miRNAs en las muestras control (aquellos miRNAs con <35 ciclos o Ct). Un ejemplo de una gráfica que muestra la amplificación de los miRNAs por PCR en tiempo real es la Figura 2.



ΔRn = Diferencia de la señal de fluorescencia.

FIGURA 2. Gráfica de la detección de miRNAs amplificados durante el proceso de PCR.

En las placas se incluyen además varios controles endógenos para ser usados como normalizadores o “housekeeping” para el análisis de los datos del PCR en tiempo real; estos controles endógenos están constituidos por: U6snRNA, RNU44, RNU48, RNU24, RNU43, RNU6B (ARNs nucleares) y un ath-miR159a (miRNA de Arabidopsis thaliana miR159a). Sin embargo, el análisis mediante el programa NormFinder reveló que todos los controles endógenos contenidos en las placas

mostraban la mayor varianza de todos los miRNAs detectados y por tanto no eran buenos normalizadores. Debido a lo anterior, se utilizó la media de la expresión global de todos los miRNAs detectados como normalizador (Mestdagh *et al*, 2009). Una vez normalizados los datos, se procedió a analizar si eran homogéneos entre los miembros del mismo grupo de estudio, mediante la prueba de Pearson (Tabla 3). Los datos mostraron que la variaciones entre la muestras MPM-2, MPM-3, MPM-4 y MPM-5 mostraron un valor de “0.668 – 0.794”, lo cual se considera homogéneo; con excepción de la muestra MPM-1 que mostró valores de “0.528 – 0.585” indicando que esta muestra mostró la más baja similitud entre las muestras de mesotelioma. En cuanto al grupo control, las variaciones que mostraron entre las muestras tuvieron valores de “0.665 – 0.828” lo que indica una homogeneidad entre las muestras del grupo, lo que indica una similitud entre las mismas.

Para identificar aquéllos miRNAs con expresión aberrante o alterada en MPM, se compararon los niveles de expresión de los miRNAs detectados en MPM versus los niveles de expresión de sus correspondientes miRNAs en las muestras controles. Se consideraron miRNAs alterados en MPM (sobre-expresados o sub-expresados) aquéllos cuyos niveles de expresión presentaran una diferencia estadística (“P” ≤ 0.05) y un valor de cambio > 2 , con relación a grupo Control.

La figura 3 y la figura 4 muestran una gráfica de “volcán” que representa los miRNAs totales detectados en el PCR-Array. El eje de la “Y” representa el valor de “P” en el sistema logarítmico; y la línea divisoria en 1.301 ($-\log 0.05$) representa el punto de corte por arriba del cual la $p \leq 0.05$. El eje “X” muestra los valores de cambio (\log_2) donde se señalan los valores -1 y 1 que representan el punto de corte donde el valor de cambio es mayor de 2 (valor + o -). En el cuadrante superior derecho en color rojo se muestran los miRNAs sobre-expresados y en el cuadrante superior izquierdo en color verde se encuentran los miRNAs sub-expresados.

La tabla 4 muestra la identidad de los miRNAs que se encuentran diferencialmente expresados en MPM versus Control. Los datos indicaron que 20 miRNAs fueron expresados diferencialmente en las muestras analizadas. De estos 20 miRNAs, 11 fueron sub-expresados (hsa-miR-517b, hsa-miR-627, hsa-miR-766, hsa-miR-101, hsa-

miR-501, hsa-miR-212, hsa-miR-596, hsa-miR-145, hsa-miR-671-3p, hsa-miR-181a, hsa-miR-18a#) y 9 miRNAs sobre-expresados (hsa-miR-30e-3p, hsa-miR-34a#, hsa-miR-622, hsa-miR-339-3p, hsa-let-7g, hsa-miR-196b, hsa-miR-135b, hsa-miR-18a y hsa-miR-302b).

TABLA 3. Valores del coeficiente de correlación de Pearson de las muestras analizadas.

MUESTRA	Ctrl-1	Ctrl-2	Ctrl-3	Ctrl-4	Ctrl-5	MPM-1	MPM-2	MPM-3	MPM-4	MPM-5
Ctrl-1	1,000	0,828	0,744	0,689	0,768	0,529	0,621	0,637	0,758	0,694
Ctrl-2	0,828	1,000	0,681	0,665	0,780	0,509	0,580	0,590	0,674	0,647
Ctrl-3	0,744	0,681	1,000	0,745	0,811	0,567	0,695	0,775	0,780	0,816
Ctrl-4	0,689	0,665	0,745	1,000	0,774	0,504	0,550	0,642	0,655	0,722
Ctrl-5	0,768	0,780	0,811	0,774	1,000	0,537	0,619	0,748	0,712	0,767
MPM-1	0,529	0,509	0,567	0,504	0,537	1,000	0,551	0,528	0,585	0,571
MPM-2	0,621	0,580	0,695	0,550	0,619	0,551	1,000	0,668	0,761	0,775
MPM-3	0,637	0,590	0,775	0,642	0,748	0,528	0,668	1,000	0,773	0,794
MPM-4	0,758	0,674	0,780	0,655	0,712	0,585	0,761	0,773	1,000	0,790
MPM-5	0,694	0,647	0,816	0,722	0,767	0,571	0,775	0,794	0,790	1,000

Ctrl = Control

MPM = Mesotelioma Pleural Maligno

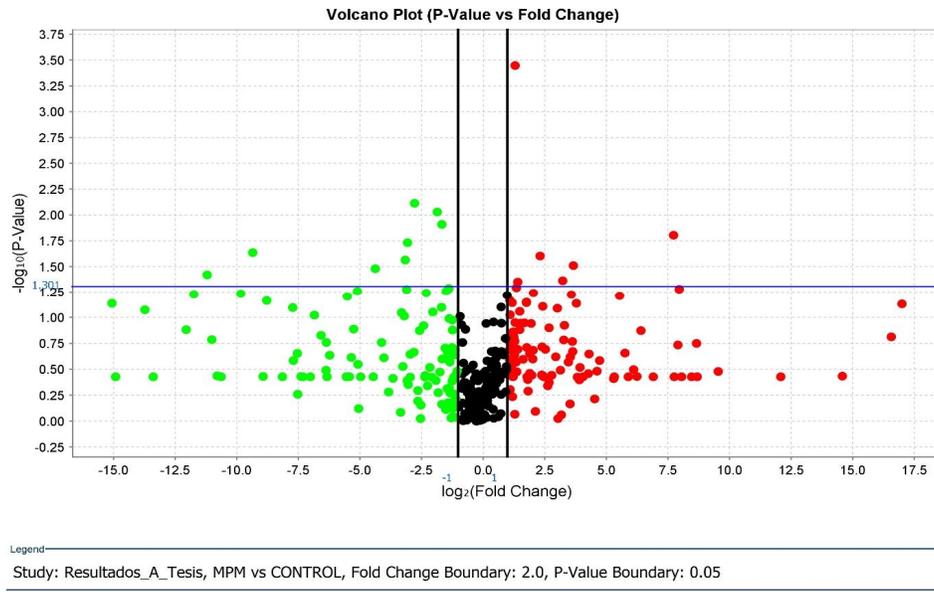


FIGURA 3. Muestra los miRNAs (Placa A) detectados del análisis de los grupos MPM vs Control, se encuentran en la parte superior del punto de corte: del lado derecho se encuentran los miRNAs sobre-expresados (rojo) y del lado izquierdo los miRNA sub-expresados (verde).

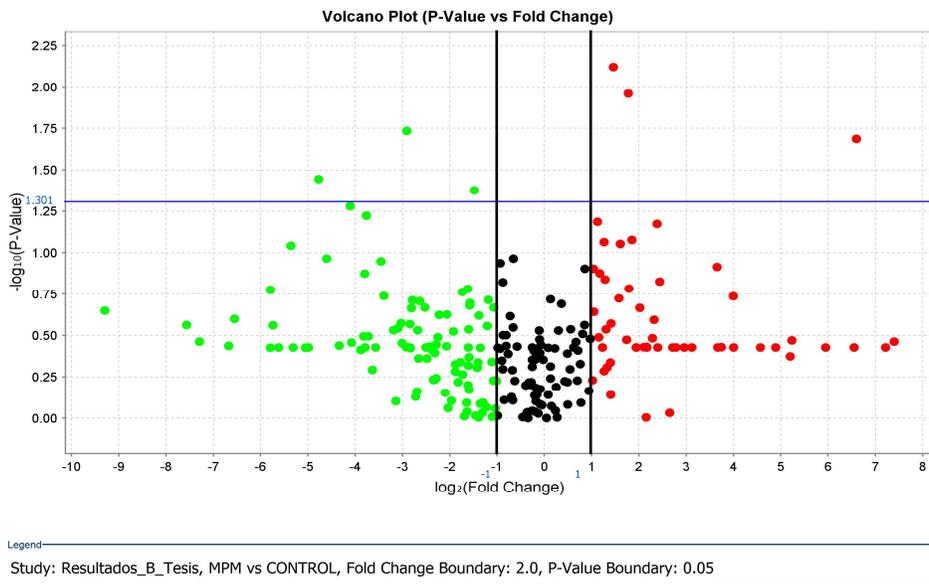


FIGURA 4. Muestra los miRNAs (Placa B) detectados del análisis de los grupos MPM vs Control, se encuentran en la parte superior del punto de corte: del lado derecho se encuentran los miRNAs sobre-expresados (rojo) y del lado izquierdo los miRNAs sub-expresados (verde).

TABLA 4. Muestra los miRNAs que se encuentran diferencialmente expresados en MPM vs Control. Los miRNAs sub-expresados (verde); los miRNAs sobre-expresados (rojo); con un Valor de $P < 0.05$.

miRNAs	LOG ₂ RQ	RQ	Valor "P"
hsa-miR-517b-3p	-11.217	0.00042	0.038
hsa-miR-627	-8.966	0.002	0.023
hsa-miR-766-3p	-4.756	0.037	0.036
hsa-miR-101-3p	-4.381	0.048	0.033
hsa-miR-501-5p	-3.158	0.112	0.027
hsa-miR-212-3p	-3.059	0.12	0.019
hsa-miR-596	-2.911	0.133	0.018
hsa-miR-145-5p	-2.776	0.146	0.008
hsa-miR-671-3p	-1.857	0.276	0.009
hsa-miR-181a-5p	-1.667	0.315	0.012
hsa-miR-18a-3p	-1.482	0.358	0.042
hsa-miR-30e-3p	1.459	2.75	0.008
hsa-miR-34a-3p	1.774	3.419	0.011
hsa-miR-622	6.598	96.855	0.021
hsa-miR-339-3p	11.274	2476	0.000
hsa-let-7g-5p	11.379	2663	0.045
hsa-miR-196b-5p	12.283	4983	0.025
hsa-miR-135b-5p	13.193	9365	0.043
hsa-miR-18a-5p	13.634	12715	0.031
hsa-miR-302b-3p	17.704	213572	0.016

RQ = Cuantificación relativa

3. Análisis de los Blancos Predictivos de los miRNAs de interés

Para identificar los genes blanco de los microRNAs de interés, se utilizó el programa TargetScan que utilizan algoritmos para predecir la presencia de dominios de apareamiento entre la secuencia semilla del miRNA y el transcrito analizado (ARNm) (ver material y métodos). De esta forma se encontró que el hsa-miR-517b-3p presenta 43, hsa-miR-627 presenta 142, hsa-miR-766-3p presenta 356, hsa-miR-101-3p presenta 803, hsa-miR-501-5p presenta 274, hsa-miR-212-3p tiene 146, hsa-miR-596 predice 129, hsa-miR-145-5p tiene 731, hsa-miR-671-3p presenta 5, hsa-miR-181a-5p tiene 626, hsa-miR-18a-3p predice 132, hsa-miR-30e-3p tiene 182, hsa-miR-34a-3p presenta 387, hsa-miR-622 tiene 329, hsa-miR-339-3p presenta 16, hsa-let-7g-5p tiene 17, hsa-miR-196b-5p predice 38, hsa-miR-135b-5p presenta 69, hsa-miR-18a-5p tiene 132 y hsa-miR-302b-3p presenta 14 blancos predictivos.

Lo siguiente fue analizar la posible relevancia biológica de los miRNAs alterados en la patogenia del MPM, mediante la identificación de las vías de señalización donde se encuentren involucrados los blancos predictivos de los miRNAs analizados. Para ello se utilizó el programa miRSystem, el cual utiliza varios métodos estadísticos para calcular en cuáles vías de señalización se encuentran los genes blancos en forma enriquecida. Mediante este programa se determinaron las cinco principales vías de señalización con un valor de ≤ 0.05 y que presentaran una asociación con mecanismos neoplásicos. Los datos indicaron que los cinco principales vías fueron: inmunología adquirida, vías de señalización del Wnt, efectores directos del p53, vías de cáncer y vías de activación de la familia de RAS (TABLA 5). Sólo 17 de los 20 miRNAs alterados fueron asociados a estas vías (Tabla 6), mientras que los hsa-miR-18a-3p, hsa-miR-34a-3p y hsa-miR-339-3p no presentaron blancos predictivos enriquecidos en las mismas. hsa-miR-501-5p fue asociado a todas las vías de señalización, seguido por -766-3p, -101-3p, -212-3p, -181a-5p, -622, -let-7g-5p, and -196b-5p que fueron asociadas a cuatro vías (Tabla 6).

TABLA 5. Las 5 vías de señalización principales donde se encuentran enriquecidos los blancos predictivos de los miRNAs de interés

BASE DE DATOS	VIA DE SEÑALIZACION	#GENES BLANCOS	# miRNAs CON BLANCOS EN ESTAS VIAS	**VALOR DE "P"
REACTOME	INMUNOLOGIA ADQUIRIDA	21	16	1.38E-05
KEGG	VIA SEÑALIZACION DEL WNT	3	7	2.43E-04
PATHWAY INTERACTION DATABASE	EFFECTORES DIRECTOS DEL P53	3	7	6.65E-04
KEGG	VIAS EN CANCER	21	17	1.53E-02
PATHWAY INTERACTION DATABASE	VIA DE ACTIVACION DE LA FAMILIA DE RAS	7	11	2.05E-02

Los miRNAs diferencialmente expresados en MPM fueron analizados mediante el miRSystem para encontrar las 5 primeras vías de señalización donde los blancos predictivos se encuentran enriquecidos ($p \leq 0.05$), y que están asociados a la patogénesis del MPM.

** Valores de "P" se obtuvieron mediante prueba hipergeométrica.

TABLA 6. Lista de los miRNAs con expresión alterada en MPM que se asocian a vías en cancer, inmunología adquirida, vías de activación de la familia RAS, vía de efectores directos del P53 y vías señalización del Wnt.

MicroRNA	VÍAS EN CÁNCER	INMUNOLOGÍA ADQUIRIDA	VÍA DE ACTIVACIÓN DE LA FAMILIA DE RAS	EFFECTORES DIRECTOS DEL P53	VÍA SEÑALIZACIÓN DEL WNT	HITS
hsa-miR-517b-3p	V			V		2
hsa-miR-627	V	V			V	3
hsa-miR-766-3p	V	V	V		V	4
hsa-miR-101-3p	V	V	V	V		4
hsa-miR-501-5p	V	V	V	V	V	5
hsa-miR-212-3p	V	V	V	V		4
hsa-miR-596	V	V			V	3
hsa-miR-145-5p	V	V	V			3
hsa-miR-671-3p	V	V	V			3
hsa-miR-181a-5p	V	V	V	V		4

TABLA 6. Lista de los miRNAs con expresión alterada en MPM (CONTINUACIÓN).

hsa-miR-30e-3p	V	V	V			3
hsa-miR-622	V	V	V	V		4
hsa-let-7g-5p	V	V	V		V	4
hsa-miR-196b-5p	V	V	V		V	4
hsa-miR-135b-5p	V	V			V	3
hsa-miR-18a-5p	V	V		V		3
hsa-miR-302b-3p	V	V				2

Análisis mediante miRSystem.

V= genes blanco en la correspondiente vía de señalización.

No se encontraron genes blancos para los hsa-miR-18a-3p, hsa-miR-34a-3p y hsa-miR-339-3p enriquecidos en estas vías.

El siguiente paso fue realizar la búsqueda de las moléculas reportadas en la literatura que estuvieran involucradas en la patogénesis del MPM y mecanismos neoplásicos y cruzar la información obtenida con la lista de los múltiples blancos predictivos de los miRNAs de interés.

El análisis de información disponible en la literatura demostró dos vías importantes involucradas en la patogénesis de neoplasias malignas que son la vía de activación por COX-2 (Ciclooxigenase 2) y la vía del TGF- β (Transforming Growth Factor beta). En la primera vía, la molécula COX-2 se encuentra sobre-expresada en cáncer de próstata, hepatoma y MPM. En la segunda vía, las moléculas FOS (FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog) y SMAD2 (SMAD family member 2) se encuentran sobre-expresadas en hepatoma y MPM. El análisis comparativo demostró que COX-2, FOS y SMAD2 son blancos predictivos del hsa-miR-101-3p, mientras que FOS y SMAD2 son blancos predictivos del hsa-miR-181a-5p. Datos revelaron que SMAD2 es además blanco predictivo del hsa-miR-212-3p (tabla 7 y tabla 8). Los tres miRNAs señalados anteriormente se encontraron sub-expresados en MPM y debido a que los miRNAs suprimen la expresión de sus blancos entonces se predice que COX-2, FOS y SMAD2 podrían estar sobre-expresados en MPM. Lo anterior coincide con los datos en la literatura que señala a COX-2 y a FOS/SMAD2 como moléculas sobre-expresadas en tejido diagnosticado con MPM (O'Kane *et al*, 2010; Hao *et al*, 2011; Fuji *et al*, 2012; Huang *et al*, 2012).

TABLA 7. miRNAs seleccionados con blancos predictivos comunes asociados a procesos neoplásicos.

miRNA	BLANCO PREDICTIVO ¹	BLANCO VALIDADO	ASOCIACIÓN DEL BLANCO PREDICTIVO CON PROCESOS NEOPLÁSICO	REFERENCIA
hsa-miR-101-3p	COX2 ^{2, 3} , FOS ⁴ , SMAD2 ⁵	COX2 ²	Cáncer de Prostata ² , Hepatoma ⁴ , MPM ^{3, 5}	1. TargetScan (https://www.targetscan.org/); 2. Hao Y. <i>et al</i> , 2011; 3. O'Kane S.L. <i>et al</i> , 2010; 4. Huang Y. <i>et al</i> , 2012; 5. Fuji M. <i>et al</i> , 2012.
hsa-miR-181a-5p	FOS ⁴ , SMAD2 ⁵		Hepatoma ⁴ , MPM ⁵	1. TargetScan (https://www.targetscan.org/); 4. Huang Y. <i>et al</i> , 2012; 5. Fuji M. <i>et al</i> , 2012.
hsa-miR-212-3p	SMAD2 ⁵		MPM ⁵	1. TargetScan (https://www.targetscan.org/); 5. Fuji M. <i>et al</i> , 2012.

TABLA 8-A. Genes de interés para el hsa-miR-101-3p.

GEN DE INTERÉS	TRANSCRITO REPRESENTATIVO	NOMBRE DEL GEN	SITIOS CONSERVADOS			
			Total	8mer	7mer-m8	7mer-1A
COX2	NM_000963	Ciclooxigenase 2	1	1	0	0
FOS	NM_005252	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	1	1	0	0
SMAD2	NM_001003652	SMAD family member 2	1	1	0	0

TABLA 8-B. Genes de interés para el hsa-miR-181a-5p.

GEN DE INTERÉS	TRANSCRITO REPRESENTATIVO	NOMBRE DEL GEN	SITIOS CONSERVADOS			
			Total	8mer	7mer-m8	7mer-1A
FOS	NM_005252	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	1	0	1	0
SMAD2	NM_001003652	SMAD family member 2	1	0	1	0

TABLA 8-C. Genes de interés para el hsa-miR-212-3p.

GEN DE INTERÉS	TRANSCRITO REPRESENTATIVO	NOMBRE DEL GEN	SITIOS CONSERVADOS			
			Total	8mer	7mer-m8	7mer-1A
SMAD2	NM_001003652	SMAD family member 2	1	0	1	0

VII. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue identificar miRNAs con valor potencial de diagnóstico para MPM, para lo cual se realizó una prueba de tamizaje para identificar cuantitativamente los miRNAs en tejido pleural diagnosticado con MPM que presentaran un nivel de expresión alterado en relación a los miRNAs expresados en tejido sano adyacente como control.

El primer paso fue seleccionar muestras de tejido pleural cuyo diagnóstico clínico, radiológico e histológico fuera de MPM. Lo anterior es relevante para este estudio debido -precisamente- a que es difícil alcanzar un diagnóstico certero de esta enfermedad y se requiere que todos los datos diagnósticos coincidan. El segundo punto importante fue la cantidad de células neoplásicas presentes en la muestra analizada. Lo anterior debido a que podrían obtenerse datos representativos de – por ejemplo- inflamación, en lugar de datos representativos de la neoplasia. Por lo anterior, en este trabajo se verificó la presencia de al menos 80% de células neoplásicas en las muestras de MPM.

Una vez seleccionadas las muestras adecuadas, se seleccionó un método de tamizaje para la determinación cuantitativa de los miRNAs. La prueba de tamizaje elegida (PCR-Array) permitió la detección cuantitativa de múltiples miRNAs simultáneamente, por lo que presenta una ventaja sobre otras pruebas de tamizaje como los microarreglos la cual es semicuantitativa. Es importante mencionar que la calidad del PCR en tiempo real fue verificada mediante una normalización adecuada de los datos. Así mismo, se anexa la información correspondiente a las recomendaciones de la MIQE (por sus siglas en inglés Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) (Bustin *et al*, 2009) (véase Anexo-Tabla 1) para la homogenización de datos y criterios para la técnica de PCR en tiempo real.

El diseño experimental anteriormente mencionado nos permitió obtener datos confiables, por lo que procedemos a discutir los resultados. Los resultados

demonstraron un total de 20 miRNAs con niveles de expresión alterados en MPM comparado con tejido sano, de los cuales 11 fueron sub-expresados y 9 sobre-expresados. Se encontraron evidencias de que 17 de los 20 miRNAs participan en cinco vías de señalización que pueden asociarse a procesos neoplásicos e incluso a la respuesta inmunológica adquirida. Lo anterior coincide con uno de los mecanismos de patogenia del MPM propuestos, donde el daño causado por las fibras de asbesto induce un ciclo de daño tisular y de respuesta inflamatoria que conducen finalmente al desarrollo del mesotelioma (Hillegass *et al*, 2010; Carbone *et al*, 2012; Jean *et al*, 2012; Matsuzaki *et al*, 2012;). De forma notable, la vía del Wnt ha sido asociada directamente con el desarrollo del MPM, lo que respalda la relevancia biológica potencial de los miRNAs detectados.

Resalta el hecho de que el hsa-miR-501-5p se asocia a las cinco vías, mientras que hsa-miR-101-3p, hsa-miR-181a-5p y -212-3p se asocia a cuatro de ellas y que estos miRNAs sub-expresados presentan blancos predictivos en moléculas asociadas con la patogénesis del MPM y otras neoplasias en la literatura. Dichas moléculas se han reportado sobre-expresadas en tejido neoplásico, lo cual coincide con el hecho de que los miRNAs señalados se encuentran sub-expresados en nuestro trabajo.

Es relevante señalar que dos de los miRNAs (hsa-miR-181a-5p y -212-3p) inciden en una misma vía (TGF- β) de forma redundante, y ésta vía ha sido directamente involucrada en la patogénesis del MPM. Si el desarrollo de una neoplasia es el resultado de un conjunto de anormalidades que la célula ya es incapaz de compensar, una anormalidad redundante podría contribuir a esta hipótesis. En cuanto al hsa-miR-101-3p, el blanco que afecta es COX-2, ya existen varios trabajos que reportan la participación de esta molécula en el desarrollo del MPM cuando se sobre-expresa (véase Anexo-Figura 1).

Con las evidencias anteriores es posible enfatizar la posible relevancia biológica de cuatro miRNAs sub-expresados en la patogénesis de MPM. Lo anterior nos permite señalar miRNAs con potencial de diagnóstico y que además de encontrarse alterados en el tejido pleural con mesotelioma, pueden ser asociados a mecanismos de patogénesis de la enfermedad.

Cabe mencionar que una debilidad del presente trabajo es el número inicial de muestras. Sin embargo, fue posible fortalecer este trabajo con los datos de bioinformática realizados y con la planeación del siguiente trabajo que es la determinación de los 17 miRNAs encontrados (con énfasis en los cuatro sub-expresados) en un mayor número de muestras. Un número de muestra representativo de la población se calcula con la fórmula de la figura 5.

Figura 5. Fórmula para el cálculo de muestras representativas de una población.

$$n = \frac{N\sigma^2Z^2}{(N-1)e^2 + \sigma^2Z^2}$$

n = el tamaño de la muestra.

N = tamaño de la población.

σ = Desviación estándar de la población que, generalmente cuando no se tiene su valor, suele utilizarse un valor constante de 0,5.

Z = Valor obtenido mediante niveles de confianza. Es un valor constante que, si no se tiene su valor, se lo toma en relación al 95% de confianza equivale a 1,96 (como más usual) o en relación al 99% de confianza equivale 2,58, valor que queda a criterio del investigador.

e = Límite aceptable de error muestral que, generalmente cuando no se tiene su valor, suele utilizarse un valor que varía entre el 1% (0,01) y 9% (0,09), valor que queda a criterio del encuestador.

VIII. CONCLUSIONES

- Se identificaron 20 miRNAs con niveles alterados de expresión en tejido pleural diagnosticado con MPM subtipo epiteloide versus tejido sano.
- 17 de los miRNAs identificados están asociados a vías en cáncer, inmunología adquirida, vías de activación de la familia RAS, vía de efectores directos del P53 y vías señalización del Wnt.
- Cuatro miRNAs sub-expresados (hsa-miR-501-5p, hsa-miR-101-3p, hsa-miR-181a-5p y hsa-miR-212-3p) presentan blancos predictivos en dos vías (COX-2 y TGF- β) asociadas con el desarrollo de MPM en la literatura.
- Se proponen como posibles marcadores de diagnóstico a los 17 miRNAs, (hsa-miR-517b-3p, hsa-miR-627, hsa-miR-766-3p, hsa-miR-101-3p, hsa-miR-501-5p, hsa-miR-212-3p, hsa-miR-596, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-671-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-30e-3p, hsa-miR-622, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-18a-5p y hsa-miR-302b-3p) con énfasis en los cuatro miRNAs sub-expresados (hsa-miR-501-5p, hsa-miR-101-3p, hsa-miR-181a-5p y hsa-miR-212-3p).
- Se propone analizar los 17 miRNAs identificados en un mayor número de muestras para verificar la significancia diagnóstica de dichos miRNAs.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asangani I.A., Rasheed S.A., Nikolova D.A., Leupold J.H., Colburn N.H., Post S., Allgayer H. MicroRNA- 21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*. 2008; 27(15): 2128-2136.
- Ávila-Moreno F., Urrea F., Ortiz-Quintero B. MicroRNAs en el diagnóstico y prognosis del cáncer pulmonar. *Rev Invest Clin*. 2011; 63(5): 516-535.
- Azuma-Mukai A., Oguri H., Mituyama T., Qian Z.R., Asai K., Siomi H., Siomi M.C. Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105(23): 7964-7969.
- Bagheri R., Haghi S.Z., Rahim M.B., Attaran D., Toosi M.S. Malignant pleural mesothelioma: clinicopathologic and survival characteristic in a consecutive series of 40 patients. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2011; 17(2): 130-136.
- Bianchi C., Bianchi T. Malignant mesothelioma: global incidence and relationship with asbestos. *Ind Health*. 2007; 45(3): 379-387.
- Bloomston M., Frankel W.L., Petrocca F., Volinia S., Alder H., Hagan J.P., Liu C.G., Bhatt D., Taccioli C., Croce C.M. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA*. 2007; 297(17): 1901-1908.
- Boutin C., Schlessler M., Frenay C., Astoul P. Malignant pleural mesothelioma. *Eur Respir J*. 1998; 12(4): 972-981.
- Brennecke J., Hipfner D.R., Stark A., Russell R.B., Cohen S.M., Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the pro-apoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*. 2003; 113(1): 25-36.
- Bussaca S., Germano S., De Cecco L., Rinaldi M., Comoglio F., Favero F., Murer B., Mutti L., Pierotti M., Gaudino G. MicroRNA signature of malignant

- mesotelioma with potencial diagnostic and prognostic implication. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010; 42(3): 312-319.
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009; 55(4): 611-622.
- Calin G.A., Croce C.M. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res.* 2006; 66(15): 7390-7394.
- Carbone M., Yang H. Molecular pathways: targeting mechanisms of asbestos and erionite carcinogenesis in mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(3): 598-604.
- Carthew R.W., Sontheimer E.J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* 2009; 136(4): 642-655.
- Ceresoli G.L., Gridelli C., Santoro A. Multidisciplinary treatment of malignant pleural mesothelioma. *The Oncologist.* 2007; 12(7): 850-863.
- Dedes K.J., Natrajan R., Lambros M.B., Geyer F.C., Lopez-Garcia M.A., Savage K., Jones R.L., Reis-Filho J.S. Down-regulation of the miRNA master regulators Drosha and Dicer is associated with specific subgroups of breast cancer. *Eur J Cancer.* 2011; 47(1): 138-150.
- Delgermaa V., Takahashi K., Park E.K., Le G.V., Hara T., Sorahan T. Global mesothelioma deaths reported to the World Health Organization between 1994 and 2008. *Bull World health Organ.* 2011; 89(10): 716-724.
- Fernández-Infante B., Michel F.J. Mesotelioma pleural maligno. *An Sist Sanit Navar.* 2005; 28(supl. 1): 29-35.
- Friedman R.C., Farh K.K., Burge C.B., Bartel D.P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009; 19(1): 92-105.
- Fujii M., Toyoda T., Nakanishi H., Yatabe Y., Sato A., Matsudaira Y., Ito H., Murakami H., Kondo Y., Kondo E., Hida T., Tsujimura T., Osada H., Sekido Y. TGF- β synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. *J. Exp. Med.* 2012; 209(3): 479-494.

- García-López M.P., Barrera-Rodríguez R. Mesotelioma maligno: descripción clínica y radiológica de 45 casos con y sin exposición a asbestos. *Salud Pública Méx.* 2000; 42(6): 511-519.
- Gayosso-Gómez L.V., Salinas-Silva L.C., Zárraga-Granados G., Ramírez-Salazar E.G., Ortiz-Quintero B. MicroRNAs como herramienta potencial para el diagnóstico del mesotelioma pleural maligno. *Neumol Cir Torax.* 2013; 72(2): 173-179.
- Grimson A., Farh K.K., Johnston W.K., Garrett-Engele P., Lim L.P., Bartel D.P. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell.* 2007; 27(1): 91-105.
- Hao Y., Gu X., Zhao Y., Greene S., Sha W., Smoot D.T., Califano J., Wu T.-C., Pang X. Enforced expression of miR-101 inhibits prostate cancer cell growth by modulating the COX-2 pathway *In Vivo.* *Cancer Prev Res (Phila).* 2011; 4(7): 1073-1083.
- Hillegass, J.M., Shukla A., Lathrop S.A., MacPherson M.B., Beuschel S.L., Butnor K.J., Testa J.R., Pass H.I., Carbone M., Steele C., Mossman B.T. Inflammation precedes the development of human malignant mesotheliomas in a SCID mouse xenograft model. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1203: 7-14.
- Huang Y., Chen H.-C., Chiang C.-W., Yeh C.-T., Chen S.-J., Chou C.-K. Identification of a two-layer regulatory network of proliferation-related microRNAs in hepatoma cells. *Nucl Acids Res.* 2012; 40(20): 10478-10493.
- Husain A.N., Colby T.V., Ordoñez N.G., Krausz T., Borczuk A., Cagle P., Chirieac L.R., Churg A., Galateau-Salle F., Gibbs A.R., Gown A.M., Hammar S.P., Litzky L.A., Roggli V.L., Travis W.D., Wick M.R. Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma : a consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med.* 2009; 133(8): 1317-1331.
- Ivanov S.V., Goparaju C.M.V., Lopez P., Zavadil J., Toren-Haritan G., Rosenwald S., Hoshen M., Chajut A., Cohen D., Pass H.I. Pro-tumorigenic effects of miR-31 loss in Mesothelioma. *J Biol Chem.* 2010; 285(30): 22809-22817.

- Jean D., Daubriac J., Le Pimpec-Barthes F., Galateau-Salle F., Jaurand M.C. Molecular changes in mesothelioma with an impact on prognosis and treatment. *Arch Pathol Lab Med.* 2012; 136(3): 277-93.
- Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., Aster J.C. 2010. *Patología Estructural y Funcional.* Edit. Elsevier Saunders. Barcelona, España. 1449 págs.
- Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005; 120(1): 15-20.
- Matsuzaki H., Maeda M., Lee S., Nishimura Y., Kumagai-Takei N., Hayashi H., Yamamoto S., Hatayama T., Kojima Y., Tabata R., Kishimoto T., Hiratsuka J., Otsuki T. Asbestos-induced cellular and molecular alteration of immunocompetent cells and their relationship with chronic inflammation and carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012: 492608.
- McDonald J.C., McDonald A.D. The epidemiology of mesothelioma in historical context. *Eur Respir J.* 1996; 9(9): 1932–1942.
- Mestdagh P., Van-Vlierberghe P., De-Weer A., Muth D., Westermann F., Speleman F., Vandesompele J. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol.* 2009; 10(6): R64.
- O’Kane S.L., Eagle G.L., Greenman J., Lind M.J., Cawkwell L. COX-2 specific inhibitors enhance the cytotoxic effects of pemetrexed in mesothelioma cell lines. *Lung Can.* 2010; 67(2): 160-165.
- Park E.K., Takahashi K., Hoshuyama T., Cheng T.J., Delgermaa V., Le G.V., Sorahan T. Global magnitude of reported and unreported mesothelioma. *Environ Health Perspect.* 2011; 119(4): 514–518.
- Patnaik S.K., Kannisto E., Knudsen S., Yendamuri S. Evaluation of microRNA expression profiles that may predict recurrence of localized stage I non-small cell lung cancer after surgical resection. *Cancer Res.* 2010; 70(1): 36-45.
- Ray M., Lee-Kindler H., Malignant pleural mesothelioma: an update on biomarkers and treatment. *CHEST.* 2009; 136(3): 888-896.

- Robinson B.W.S., Lake R.A. Advances in Malignant Mesothelioma. *N Engl J. Med.* 2005; 353(15): 1591-1606.
- Santarelli L., Strafella E., Staffolani S., Amati M., Emanuelli M., Sartini D., Pozzi V., Carbonari D., Bracci M., Pignotti E., Mazzanti P., Sabbatini A., Ranaldi R., Gasparini S., Neuzil J., Tomasetti M. Association of miR-126 with soluble Mesothelin-Related Peptides, a marker for Malignant Mesothelioma. *PLoS ONE.* 2011; 6(4): e18232.
- Wu H., Zhu S., Mo Y.Y. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. *Cell Res.* 2009; 19(4): 439-448.
- Yanaihara N., Caplen N., Bowman E., Seike M., Kumamoto K., Yi M., Stephens R.M., Okamoto A., Yokota J., Tanaka T., Calin G.A., Liu C.G., Croce C.M., Harris C.C. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* 2006; 9(3): 189-198.
- Zhang X., Liu S., Hu T., Liu S., He Y., Sun S. Up-regulated microRNA-143 transcribed by nuclear factor kappa B enhances hepatocarcinoma metastasis by repressing fibronectin expression. *Hepatology.* 2009; 50(2): 490-499.
- Zhou X., Marian C., Makambi K.H., Kosti O., Kallakury B.V., Loffredo C.A., Zheng Y.L. MicroRNA-9 as potential biomarker for breast cancer local recurrence and tumor estrogen receptor status. *PLoS One.* 2012; 7(6): e39011.

ANEXO

Tabla 1. Recomendaciones de la MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) para reportar la mínima información para un experimento de qPCR.

DISEÑO EXPERIMENTAL	IMPORTANCIA	REPORTADO*	PÁGINA**
Definición de los grupo experimental y control	E	SI	10-11
Número en cada grupo	E	SI	11
¿Ensayo llevado a cabo por el centro o laboratorio del investigador?	D	SI	10
Reconocimiento de las contribuciones del autor	D	N/A	N/A
MUESTRA			
Descripción	E	SI	10-11
Volumen/Masa de la muestra procesada	D	SI	12
Microdissección o Macrodissección	E	SI	11
Procedimiento de procesamiento	E	SI	12-20
Si congela, ¿cómo y con qué rapidez?	E	N/A	N/A
Si fija, ¿con que y con qué rapidez?	E	SI	10
Duración y condiciones de almacenamiento de la muestra (especialmente para muestras)FFPE	E	SI	10
EXTRACCIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO			
Procedimiento y/o instrumentación	E	SI	11-12

Nombre del kit y detalles de alguna modificación	E	SI	11-15
Fuente de los reactivos adicionales usados	D	N/A	N/A
Detalles de tratamiento con RNasa o DNasa	E	SI	14-15
Evaluación de contaminación (ADN o ARN)	E	SI	15
Cuantificación de Ácidos nucleicos	E	SI	15
Instrumento y método	E	SI	15
Pureza (A260/A280)	D	NO	--
Rendimiento	D	SI	23
Integridad de ARN: método/instrumento	E	NO	--
RIN/RQI o Cq de transcritos 3´y 5´	E	N/A	N/A
Rastro de Electroforesis	D	N/A	N/A
Ensayo de Inhibición (diluciones Cq, pico, u otro)	E	N/A	N/A
TRANSCRIPCIÓN REVERSA			
Condiciones de la reacción completa	E	SI	15-17
Cantidad de ARN y volumen de la reacción	E	SI	16
Oligonucleótido cebador (si usa GSP) y concentración	E	N/A	N/A
Transcriptasa reversa y concentración	E	SI	16
Temperatura y tiempo	E	SI	16-17
Fabricante de los reactivos y números de catálogo	D	SI	11
Cq's con y sin transcripción reversa	D	N/A	N/A
Condiciones de almacenamiento del cDNA	D	NO	--

INFORMACIÓN DEL OBJETIVO DE qPCR			
Símbolo del gen	E	SI	36-39
Número de acceso a la secuencia	E	SI	38-39
Localización del amplicón	D	N/A	N/A
Longitud del amplicón	E	N/A	N/A
Panel de especificidad in silico (BLAST, y sucesivamente)	E	N/A	N/A
Pseudogenes, retropseudogenes, u otros homólogos	D	N/A	N/A
Secuencia de alineamiento	D	N/A	N/A
Análisis de la estructura secundaria del amplicón	D	N/A	N/A
Localización de cada primer por exón o intrón	E	N/A	N/A
Cuál variante derivada del "splicing" es la determinada	E	SI	36-39
OLIGONUCLEÓTIDOS DE qPCR			
Secuencia de primer	E	N/A	N/A
Número de identificación de RT PrimerDB	D	N/A	N/A
Secuencia de la sonda	D	N/A	N/A
Localización e identidad de cualquier modificación	E	N/A	N/A
Fabricante de los oligonucleótidos	D	SI	12
Método de purificación	D	N/A	N/A
PROTOCOLO DE qPCR			
Condiciones de la reacción completa	E	SI	18-19
Volumen de reacción y cantidad de cDNA/DNA	E	SI	18-19

Concentración de Primer, sonda, Mg^{2+} , y dNTPs	E	SI	19
Concentración e identidad de la polimerasa	E	SI	19
Fabricante e identidad del buffer/kit	E	SI	12, 29
Composición química exacta de los buffer	D	N/A	N/A
Aditivos (SYBR Green I, DMSO, y así sucesivamente)	E	N/A	TaqMan, No Aditivos
Fabricante de placas/tubos y número de catalogo	D	SI	12
Parámetros de termociclado completo	E	SI	19
Ajustes de reacción (manual/robótico)	D	N/A	N/A
Fabricante del instrumento de qPCR	E	SI	19
VALIDACIÓN DE qPCR			
Evidencia de optimización (de gradientes)	D	N/A	PCR-Array
Especificidad (gel, secuencia, dilución o digestión)	E	N/A	N/A
Para SYBR Green I, C_q de los NTC	E	N/A	N/A
Curvas de calibración con pendiente e intersección Y	E	N/A	N/A
Calculo de la eficiencia del PCR de la pendiente	E	N/A	N/A
CIs para la eficiencia del PCR o SE	D	N/A	N/A
r^2 de la curva de calibración	E	N/A	N/A
Rango dinámico lineal	E	N/A	N/A
Variación de C_q a LOD	NA	N/A	N/A
Intervalo total CIs (CIs throughout range)	D	N/A	N/A
Evidencia para LOD	E	N/A	N/A

SI multiplex, eficiencia y LOD de cada ensayo	E	NO	N/A
ANÁLISIS DE DATOS			
Programa de análisis de qPCR (Fuente y versión)	E	SI	20
Método de determinación de Cq	E	SI	20
Identificación de valores atípicos y disposición	E	NO	--
Resultados para NTCs	E	NO	--
Justificación del número y selección de genes referencia	E	SI	32-39
Descripción del método de normalización	E	SI	27
Número y concordancia de réplicas biológicas	D	SI	26-31
Número y fases (transcripción reversa o qPCR) de réplicas técnicas	E	NO	--
Repetibilidad (variación intraensayo)	E	NO	--
Reproducibilidad (variación interensayo, CV)	D	NO	--
Análisis de energía (Power analysis)	D	NO	--
Método estadístico para la significancia de resultados	E	SI	27-28
Software (fuente, versión)	E	SI	27
Cq o presentación de datos crudos con RDML	D	NO	--

E: Información esencial.

D: Información deseable.

N/A: No aplica para nuestro estudio.

***: Reportado en nuestro estudio.**

**** : Pagina en este estudio.**