



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
LICENCIATURA BIOLÓGICA

**MicroRNAs tisulares y secretados a circulación
sanguínea como biomarcadores potenciales de
diagnóstico del mesotelioma pleural maligno**

TESINA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOLOGO

P R E S E N T A
VANESSA MARTÍNEZ RIVERA

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. BLANCA ORTIZ QUINTERO



Los Reyes Iztacala, Tlanepantla, Estado de México, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICADO A MI FAMILIA

EDUARDO

RAÚL

ALICIA

AGRADECIMIENTOS

A papá y mamá por confiar en mí, por amarme y por todo lo que han hecho por nosotros; por siempre alentarme a seguir adelante y no rendirme jamás. Gracias por reírse conmigo en los días buenos y consolarme en los malos, por todos aquellos momentos de desvelo para llamarme en mis prácticas y saber cómo me encontraba, conocer mi día y recordarme su incondicional cariño. Gracias por todos esos momentos apacibles donde junto a una taza de café sólo estábamos los cuatro y nada más importaba. Les agradezco completamente su apoyo y sus consejos, pues sin ellos no sería la mujer que ahora soy. Espero llenarlos de orgullo con cada decisión y que todos sus esfuerzos se vean reflejados en mi éxito profesional. Los amo papi y mami.

A mi hermano por estar conmigo en todo momento, por tu grata compañía mientras realizaba la tesis, por ser el motivo por el cual debo y quiero ser una gran persona. Gracias por las lecciones de vida que me das, por ser ese niño con un carácter increíble y por ser la persona que siempre estas allí para darme un gran abrazo y ayudarme a salir adelante. Te agradezco infinitamente por todos los momentos de risas, por consentirme, motivarme y por todo tu cariño. Gracias por todo, te quiero mucho enano.

A Iszael por soportarme todos estos años, por ser esa persona en la que puedo encontrar a mi mejor amigo, un confidente, un novio, un maestro. Gracias por hacer de mis días momentos únicos y por levantarme cada vez que ya no puedo más, por motivarme a seguir mis metas e impulsarme a lograrlas. Gracias por permanecer en mi vida y hacerla aún más bella. Te amo chaparro.

A la Dra. Blanca Ortiz Quintero, gracias por todo el apoyo y confianza que me ha brindado, por su paciencia y la sabiduría que me transmite. Es un gran ejemplo de persona en todos los aspectos, tanto laboral como personalmente. Le agradezco profundamente la oportunidad de trabajar a su lado, en su equipo, aunque las cosas no salieran como se habían planeado me alegro mucho de haberla tenido en mi vida como mi tutora.

A mis amigos y mis tardigradas, que sin ellos nada de estos 4 años hubieran sido lo mismo; gracias por esas risas, caídas, por cada salida a campo, por el estrés de cada fin de semestre y por estar a mi lado brindándome su apoyo. Quiero agradecer especialmente a mi Ñaña por su paciencia, por soportarme con sueño, sin comer, y aún de malas siempre trató de sacarme una sonrisa, gracias por hacer de cada semestre algo diferente, espero que la vida no cambie esa forma tan genial de ser que tienes.

A Erika, Midori y Susana, por ser parte de mi familia y mi historia, por ser más que mis mejores amigas, por compartir cada momento importante conmigo, por alegrarse de mis triunfos y consolarme en mis fracasos. Gracias porque sé que cuando las necesite van a estar ahí sin importar el momento. También les agradezco por todas esas caídas, chistes, historias, bailes y los miles de atardeceres que hemos compartido, son las mejores amigas que alguien puede tener.

A mi familia, en especial a mis abuelos, gracias por ayudarme a crecer, a formarme y por consentirme. Espero que este logro sea sólo el inicio de muchos y que en todo momento estén ahí para compartirlos. Reitero el cariño que le tengo a toda mi familia y expreso mi incondicional apoyo ante cualquier situación que les competa.

Al sublime suelo que he pisado durante 24 prodigiosos años, barrio de barrios y humildad encarnada ante cada paso que en él he dado; Azcapotzalco, amor de mi vida, agradezco infinitamente tu cobijo, júbilo de mis llegadas y tristeza de mis arribos; eres el carnaval que decora el trajín de mis días, ante ti me debo, siempre, aunque lejos, te llevaré en el alma.

GRACIAS A TODOS POR FORMAR PARTE DE MI VIDA

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen	
Índice de abreviaturas	
Introducción	9
Justificación	11
Objetivo	11
Metodología	11
Resultados y discusión	12
I. Clasificación histológica y clínica del MPM	12
II. Patogenia del Mesotelioma Pleural Maligno	13
III. Diagnóstico del MPM	14
IV. Definición y biogénesis de los microRNAs	17
V. Procesos biológicos regulados por los microRNAs	15
VI. MicroRNAs secretados.	19
VII. MicroRNAs como biomarcadores de diagnóstico en neoplasias	23
VIII. MicroRNAs como biomarcadores de diagnóstico del MPM	25
Conclusiones y perspectivas	43
Literatura citada	44

RESUMEN

El mesotelioma pleural maligno (MPM) es un tumor poco frecuente pero agresivo que se origina en la pleura y se diagnostica en etapas avanzadas de la enfermedad. El MPM es difícil de diagnosticar, presenta una respuesta pobre a los tratamientos oncológicos disponibles y una supervivencia de 12 meses. El diagnóstico definitivo se basa en el análisis subjetivo y cualitativo de marcadores tisulares en muestras de tejido pleural, por lo que es necesario el desarrollo de herramientas de diagnóstico cuantitativas y no-subjetivas. Una alternativa potencial son los microRNAs (miRNAs), quienes han surgido como biomarcadores potenciales de diagnóstico de diversas neoplasias, incluyendo el MPM. Los miRNAs son RNA no-codificante que regula la expresión genética a nivel post-transcripcional mediante la inhibición de la transcripción. Los miRNAs regulan procesos celulares esenciales como el ciclo celular, la diferenciación, la proliferación, y la apoptosis. Evidencias indican que la expresión alterada de miRNAs tisulares permite distinguir tejido normal (sano) de tejido tumoral, lo que los señala como biomarcadores potenciales de diagnóstico. Aunado a lo anterior, los miRNAs secretados a circulación sanguínea pueden presentar alteraciones asociadas a la presencia de neoplasias, por lo que podrían ser biomarcadores de diagnóstico no-invasivo. Los niveles de los miRNAs tisulares y en circulación pueden ser medibles en forma cuantitativa, por ejemplo PCR en tiempo real, por lo que es factible el desarrollo de una prueba diagnóstica cuantitativa y no-subjetiva.

Este trabajo consiste en una investigación documental sistemática para analizar el valor potencial de los miRNAs tisulares y secretados a circulación sanguínea como biomarcadores de diagnóstico del mesotelioma pleural maligno. Esta investigación se basó en la consulta de publicaciones en revistas científicas con "revisión por pares" o "peer review" (término en el idioma inglés), publicadas hasta la fecha de la finalización de este trabajo.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADp	Adenocarcinoma pulmonar que invade pleura
AEC	Individuos expuestos a Asbesto
AGO	Agronauta
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BAPE	Derrame pleural benigno asociado a asbesto
ccRCC	Carcinoma renal de células claras
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DB	Paciente sin quimioterapia
CEA	Antígeno Carcinoembrionario
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
ESCTR para el Transporte FFPE	Complejo Endosomal de Clasificación Necesaria Fijado en Formalina, embebido en parafina
FPR	Relación de los falsos negativos
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HEK293	Células de Riñón de Embrión Humano
HMC	Mesotelio normal
HMGB1	High mobility group B1
LDH	Lactato Deshidrogenasa
MAPK1	Proteína mitogénica activada quinasa 1

miRNAs	microRNAs
MPM	Mesotelioma pleural maligno
MVBs	Multivesicular Bodies (Cuerpos Multivesiculares)
NF-κB	Nuclear Factor κB (Factor nuclear κB)
NK	Natural Killer
NNP	Tejido mesotelial sano adyacente con MPM y quimioterapia
NPM1	Nucleophosmin 1
NSCLC	Cáncer pulmonar de células no pequeñas
nSMase2	Esfingomielinasa neutra 2
OMS	Organización Mundial de la salud
pb	Pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
Pol II	ARN polimerasa II
RCC	Carcinoma de Células Renales
qPCR	PCR en tiempo real
TSG101	Gen de Susceptibilidad Tumoral 101
RISC	Complejo de inducción de silenciamiento del RNA
ROC	Característica Operativa del Receptor (Receiver Operating Characteristic Curves)
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RT-qPCR	PCR en Tiempo Real con Transcripción Reversa
SV40	Virus Simian 40

TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TPR	Relación de los verdaderos positivos
TTF-1	Factor de transcripción tiroideo-1
TTP	Tiempo de progresión después de cirugía

INTRODUCCIÓN

El Mesotelioma maligno es un cáncer primario del mesotelio seroso (2), el cual se desarrolla en 4 partes principales del cuerpo: peritoneo, pericardio, túnica vaginal y la pleura torácica (3); siendo el más frecuente este último. El mesotelioma pleural maligno (MPM) es un tumor agresivo, poco común y de pobre pronóstico, el cual se origina a partir de las células mesoteliales de la pleura (4-6).

La pleura es una membrana delgada y serosa formada por células mesoteliales que se derivan del mesoderma embrionario y para su posterior localiza en el tórax (7). Las células mesoteliales de la pleura descansan sobre una matriz de colágeno, fibras elásticas, vasos sanguíneos y linfáticos, cuya función es permitir la expansión y contracción del tórax y pulmones (8). La pleura consiste de dos secciones: la pleura parietal, que cubre la pared torácica y el diafragma; así como la pleura visceral que cubre los pulmones. El espacio que existe entre ambas pleuras es llamado cavidad pleural, el cual contiene de 0.5 a 1mL de líquido pleural (9-11), como se muestra en la figura 1. A este respecto el MPM se puede originar en cualquier parte de la pleura, tanto parietal como visceral, sin embargo aproximadamente el 80% de todos los casos se produce en la pleura visceral y el 20% en la pleura parietal (12).

La pleura, además de brindar lubricación y elasticidad a los pulmones durante el movimiento de inspiración y expiración, también provee de protección contra infecciones (1, 8). Adicionalmente la pleura se encuentra conformada por cinco capas celulares (3):

- 1) Capa de células mesoteliales.
- 2) Tejido conectivo mesotelial delgado con lámina basal.
- 3) Capa elástica superficial delgada.
- 4) Capa de tejido conectivo laxo que contiene el tejido adiposo, fibroblastos, mastocitos y otras células mononucleares incluyendo vasos sanguíneos, nervios y vasos linfáticos.
- 5) Capa fibroelástica profunda adherida a pulmón y músculo torácico.

Las células mesoteliales son derivadas de la cavidad celómica en la cavidad pleura, estas células en estado fisiológico de normalidad están conformadas por una capa lisa, brillante y semitransparente (7).

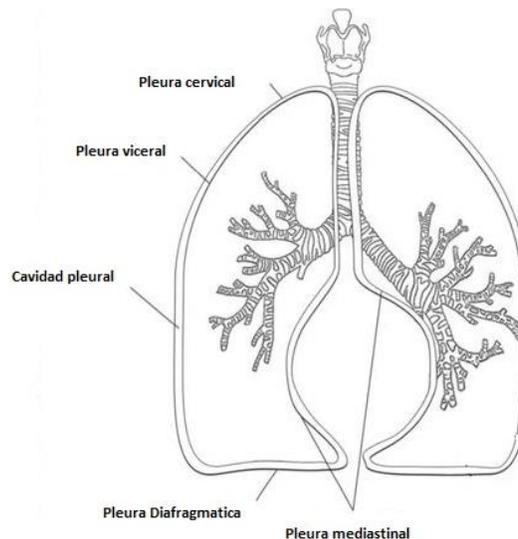


Figura 1. Esquema de las partes que conforman la pleura en la cavidad torácica. Tomada y modificada de De Paoli, *et al*, 2015 (1).

El MPM es un tumor que generalmente se asocia con exposición al asbesto en 80% de los casos (4, 6, 13). Los síntomas de la enfermedad se manifiestan después de un periodo de 20-40 años desde la exposición al carcinógeno, y presenta una sobrevida de 9-12 meses (4-6, 14). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó 92,252 muertes en el periodo 1994-2008 debido a esta enfermedad a nivel mundial (15), pero se sugiere que la cifra está subestimada por la falta de registros confiables del diagnóstico del MPM (16). Se predice además un incremento en la incidencia mundial del mesotelioma en 10-20 años, basados en los periodos de alta exposición al asbesto (4). El MPM es difícil de diagnosticar, presenta una respuesta pobre a los tratamientos oncológicos disponibles y una sobrevida de 12 meses. El diagnóstico definitivo se basa en el análisis subjetivo y cualitativo de marcadores tisulares en muestras de tejido pleural mediante inmunohistoquímica, lo que contribuye a la dificultad de su diagnóstico certero y al diagnóstico en etapas avanzadas de la enfermedad.

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, o bien a su difícil diagnóstico, falta de terapias efectivas, y la agresividad de la enfermedad (4-6, 14). En particular, el diagnóstico difícil de esta enfermedad señala la necesidad de métodos alternativos de diagnóstico, preferentemente métodos cuantitativos

y no-subjetivos. Los MicroRNAs (miRNAs) son RNAs pequeños no-codificantes que regulan la expresión genética a nivel post-transcripcional. Éstos han sido señalados como biomarcadores potenciales de diagnóstico de múltiples neoplasias, incluyendo el MPM y pueden cuantificarse tanto en tejido como en fluidos corporales como sangre periférica, por lo que ofrecen una alternativa viable a la necesidad de nuevos métodos diagnósticos.

JUSTIFICACIÓN

El mesotelioma pleural maligno (MPM) es un tumor poco frecuente pero agresivo, que se diagnostica generalmente en etapas avanzadas de la enfermedad debido a que su diagnóstico certero es difícil de alcanzar. El método diagnóstico considerado “estándar de oro” se basa en el análisis subjetivo y cualitativo de marcadores tisulares en muestras de tejido pleural, por lo que es necesario el desarrollo de herramientas alternativas de diagnóstico que sean cuantitativas y no-subjetivas. Una alternativa potencial son los microRNAs (miRNAs), quienes han surgido como biomarcadores potenciales de diagnóstico de diversas neoplasias, incluyendo el MPM.

OBJETIVO

Analizar el valor predictivo de los microRNAs tisulares y secretados a circulación sanguínea como potenciales biomarcadores de diagnóstico y pronóstico del mesotelioma pleural maligno, mediante en la búsqueda y revisión sistémica de trabajos de investigación publicados a la fecha.

METODOLOGÍA

Se desarrollará la investigación documental del tema “microRNAs tisulares y secretados a circulación sanguínea como biomarcadores de diagnóstico del MPM” mediante la búsqueda sistémica y consulta del contenido teórico y experimental de publicaciones en revistas científicas con “revisión de pares” o “peer review” (en el idioma inglés), publicadas hasta la fecha de la finalización de este trabajo. Lo anterior permitirá la descripción del estado del arte histórico y actual del tema aquí propuesto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA, CLÍNICA Y ESTADIO DEL MPM

El MPM se clasifica histológicamente en 3 tipos: sarcomatoide, mixto y epiteloide (14, 17), siendo este último el más frecuente con 60% de los casos (18). El tipo histológico epiteloide se clasifica a su vez en los subtipos tubulopapilar, adenomatoide, laminar, de células pequeñas, de células claras y deciduoides (Tabla 1). Esta clasificación se basa en los patrones celulares, en la relación núcleo-citoplasma y organización histológica que posee cada tipo de MPM (19-21).

Tipo de MPM	Característica	Subtipos
Epiteloide	Las células pueden ser oval, cuboide o poligonal, con una cantidad moderada de citoplasma eosinófilo y núcleos redondos con nucléolos prominentes	Tubulopapilar, adenomatoide (microglandular), láminar, células pequeñas, células claras y deciduoid.
Sarcomatoide	Se compone de células fusiformes malignas que crecen en fascículos o al azar dentro de estroma fibroso.	
Bifásico	Posee áreas con los tipos epiteloide y sarcomatoide, que comprenden al menos el 10% del tumor.	

La clasificación clínica o estadio del MPM se refiere a la extensión anatómica aparente de la enfermedad, y se basa en la descripción de los componentes de la escala llamada TNM, donde T es la extensión del tumor primario; N representa la ausencia o presencia del tumor infiltrado a nódulos linfáticos y M es la ausencia o presencia de tejido tumoral metastásico (**Tabla 2 y 3**) (22). De acuerdo a la “Classification Tumours of the Lung,

Pleura, Thymus and Heart” de la OMS (23), la T para los tumores pleurales se clasifica en:

- a. T1: El tumor se encuentra en la pleura parietal ipsilateral
- b. T1a: El tumor se encuentra en la pleura ipsilateral parietal (mediastínica, diafragmática). No hay rastro del tumor en la pleura visceral.
- c. T1b: El tumor se encuentra en la pleura parietal ipsilateral (mediastínica, diafragmática), con afectación focal de la pleura visceral.
- d. T2: El tumor se encuentra en cualquier superficie pleural ipsilateral, con al menos una de las siguientes características: tumor pleural visceral confluyente (incluyendo la fisura), invasión del músculo diafragmático y/o . invasión del parénquima pulmonar
- e. T3: El tumor se encuentra en cualquier superficie pleural ipsilateral, con al menos una de las siguientes características: invasión de la fascia endotorácica, invasión en la grasa mediastínica, foco solitario del tumor que invade los tejidos blandos de la pared torácica y/o compromiso no transmural del pericardio.
- f. T4: : El tumor se encuentra en cualquier superficie pleural ipsilateral, con al menos una de las siguientes características: invasión difusa o multifocal de los tejidos blandos de la pared torácica, cualquier foco en la costilla, invasión a través del diafragma hasta el peritoneo, invasión de cualquier órgano mediastínico, extensión directa a la pleura contralateral, invasión en la columna vertebral, extensión a la superficie interna del pericardio, derrame pericárdico con citología positiva, invasión del miocardio, invasión del plexo braquial

La presencia o ausencia de células tumorales en nódulos linfoides se clasifica mediante:

- a. NX: Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados
- b. N0: No hay metástasis ganglionares regionales
- c. N1: Metástasis en ganglios linfáticos broncopulmonares y/o hiliares ipsilaterales
- d. N2: Metástasis en el (los) ganglio(s) linfático(s) subcarinal y/o nódulo(s) linfático(s)
- e. N3: Metástasis en el ganglio linfático supraclavicular o escalar contralateral, mediastínico, mamario interno o hilar y/o ganglio linfático supraclavicular o escaleno ipsilateral o contralateral.

La presencia de metástasis a distancia se clasifica mediante la M:

- a. M0: No hay metástasis a distancia
- a. M1: Metástasis distante

Tabla 2. Clasificación clínica de los estadios del cáncer basado en la TNM según la OMS

Estadio del cancer	TMN
Estadio IA	T1a N0 M0
Estadio IB	T1b N0 M0
Estadio II	T2 N0 M0
Estadio III	T1,2 N1 M0 T1,2 N2 M0 T3 N0,1,2 M0
Estadio IV	T4 N0,1,2,3 M0 T1,2,3,4 N3 M0 T1,2,3,4 N0,1,2,3 M1

Tabla 3. Clasificación de TNM para tumores de pulmón, pleura, timo y corazón según WHO

Tumor primario	TX	Tumor primario que no puede ser evaluado
	T0	No hay evidencia de tumor primario
	T1, T1a, T1b, T2, T3, T4	Incremento de tamaño y/o extensión local del tumor primario
Nódulos linfáticos regionales	NX	Nódulos linfoides regionales que no pueden ser estudiados
	N0	No hay metástasis a nódulos linfoides regionales
	N1, N2, N3	Incremento de la afectación de los nódulos linfáticos regionales
Metástasis	MX	La metástasis no puede ser estudiada
	M0	No hay metástasis
	M1	Metástasis

II. PATOGENIA DEL MESOTELIOMA PLEURAL MALIGNO

La exposición a fibras de asbesto es la principal causa ambiental asociada al desarrollo de MPM, en un 85-90% de los casos a nivel internacional (22) (24). En México, Aguilar-Madrid y colaboradores en el año 2010 reportaron que 81% de los casos de MPM se encuentran asociados con la exposición al asbesto (23). Los síntomas de la enfermedad se manifiestan de 20-40 años después de la exposición al mismo (22). Las fibras de asbesto están compuestas de silicatos de hierro, sodio, magnesio y calcio, que son de estructura rígida, larga y recta como agujas con un tamaño aproximado de 8 micras de longitud y 0.25 micras de diámetro (25). Las fibras se alojan en la cavidad pleural a través de la tráquea, bronquios y alvéolo pulmonares; aunque algunas fibras logran alojarse en los nódulos linfáticos (26). Cuando las fibras de asbesto llegan a la pleura causan un daño mecánico tisular, inflamación crónica y necrosis celular (10, 27, 28). Se cree que la interacción prolongada de las fibras de asbesto con las células mesoteliales e inflamatorias inician ciclos prolongados de daño tisular, reparación tisular e inflamación local, lo que conduce finalmente a la carcinogénesis por mecanismos aún en estudio. A continuación se describirán algunos de los mecanismos moleculares identificados. Las fibras de asbestos causan necrosis de las células mesoteliales, las cuales en respuesta

traslocan la proteína High Mobility Group box 1 (HMGB1) del núcleo al citoplasma donde posteriormente es secretada al exterior. La HMGB1 es un arquetipo de las moléculas pertenecientes al grupo conocido como patrón molecular asociado a daño (DAMP), las cuales inducen inflamación y regulan los procesos de reparación tisular (29). La liberación de la HMGB1 induce que los macrófagos secreten TNF-alfa, la cual dispara una respuesta inflamatoria crónica. Durante el proceso inflamatorio, las células mesoteliales y macrófagos producen especies reactivas de oxígeno (ROS) y TNF-alfa, los cuales amplifican la respuesta inflamatoria. A su vez, ROS causa daño al DNA y aneuploidia de las células mesoteliales (30), mientras que TNF-alfa activa NF- κ B que forma parte de un mecanismo de rescate celular que favorece la sobrevivencia de las células mesoteliales dañadas. Debido a que las células mesoteliales dañadas a nivel de DNA deben ser eliminadas mediante necrosis o bien apoptosis, se sospecha que este evento podría favorecer la transformación maligna de las células que logran sobrevivir a la necrosis inducida por el asbesto (31). Yang y colaboradores demostraron la ocurrencia de los eventos anteriores en células mesoteliales humanas, y además encontraron el desarrollo de hiperplasia mesotelial en la zona de inflamación crónica, acumulación de macrófagos y depósito de fibras de asbesto en modelo de ratón (32). También encontraron evidencias de que ambas, las células mesoteliales y los macrófagos, fagocitan las fibras de asbesto; así como la localización específica del HMGB1 y TNF-alfa en las mismas áreas, usando cortes histológicos. La liberación de la HMGB1 también induce la activación de la Nalp3 inflamasoma (NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3) producida por las células inflamatorias. La Nalp3 es un complejo de señalización que activa la procaspasa-1 e induce el procesamiento de las citosinas inflamatorias dependientes de caspasa-1 IL-1 β (33). Ratones deficientes en Nalp3 muestran una disminución en la patología pulmonar que se presenta en respuesta a la exposición al asbesto, comparado con ratones silvestres (no modificados) (34).

Por otra parte, el desarrollo del MPM ha sido asociado a factores genéticos. Estudios realizados en una epidemia de MPM en Cappadocia (Turquia) y en los Estados Unidos de América demostraron que el riesgo de desarrollar esta enfermedad era transmitido con un patrón autosómico dominante en ciertas familias identificadas como de alto riesgo (35). Aunado a lo anterior, la mutación germinal del gen BAP1 ha sido asociada con un riesgo alto de desarrollar mesotelioma en algunas familias en Estados Unidos de América (36, 37). BAP1 es una enzima que elimina la ubiquitina durante la respuesta al daño al DNA y en el ciclo celular, induciendo la progresión a la fase S, necrosis celular y apoptosis (38)

BAP1 es considerada un supresor de tumores, y las mutaciones que eliminan la actividad de desubicitinación de esta enzima también eliminan su actividad supresora de tumores (38).

Otro factor de riesgo asociado al desarrollo del MPM es la exposición a radiación del tórax y abdomen a temprana edad (34). Teta y colaboradores en el 2007 (39) realizaron un estudio de vigilancia de pacientes con linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin por 30 años que presentaron MPM. Los resultados obtenidos mostraron un aumento en las tasas de mesotelioma para los pacientes con linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin que habían recibido radioterapia.

Algunos trabajos sugieren que la infección por el virus Simian 40 (SV40) está asociada al desarrollo de MPM (40-42). El SV40 es un virus cuyo principal huésped es el mono pero fue transmitido a los humanos en 1950 y 1960, mediante la contaminación de lotes tempranos de la vacuna del poliovirus, ya que inicialmente eran producidas usando líneas celulares primarias de monos y algunas de estas estaban contaminadas con SV40. Sin embargo, la evidencia que sugiere la asociación del SV40 con el MPM se considera controversial, ya que existen discrepancias en los estudios realizados en humanos (40, 42).

III. DIAGNOSTICO DEL MPM

El MPM presenta síntomas inespecíficos como fatiga, fiebre, diaforesis, palidez, pérdida de peso, disfonía, disfagia, síndrome de vena cava superior y dolor irradiado al brazo (43), por lo que no se generan una sospecha de la presencia de la enfermedad. Por otro lado, el MPM en etapas avanzadas se caracteriza por derrame de líquido pleural, dolor en pecho y disnea (dificultad para respirar), esta última generalmente es producida debido al derrame o al engrosamiento pleural (3). Estos últimos síntomas generan la sospecha de una posible neoplasia. Cuando existe la sospecha de una neoplasia, se realiza una radiografía de tórax, con la cual es posible identificar la presencia del derrame pleural, el engrosamiento pleural difuso y masas tumorales. La presencia de un engrosamiento pleural difuso y con prominencias nodulares sugiere la presencia de mesotelioma (44).

El derrame pleural, que es uno de los signos más evidentes en las placas radiológicas, no siempre es de carácter neoplásico, por lo que se clasifican en 2 tipos: trasudados y exudados. Los trasudados son el resultado de falla cardíaca, cirrosis hepática, hipoalbuminemia y diálisis peritoneal; mientras que los exudados son ocasionados por

enfermedades paraneumónicas, tuberculosis y neoplasias (45). Los trasudados y exudados se diferencian mediante los criterios de Ligth. Se identifica como exudado si cumple uno de los 3 siguientes criterios (46):

- a) Proteínas en Líquido Pleural/Proteínas en suero > 0,5
- b) Lactato Deshidrogenasa (LDH) del líquido pleural/LDH en suero >0,6
- c) LDH del líquido pleural más de dos tercios del límite superior normal para el suero

Si los niveles de proteína son menores a 30 g/L es considerado trasudado y mayor al mismo es un exudado (47). Se conoce que células de origen inmunológico se infiltran al líquido pleural en respuesta a la formación del mismo, e incluso se ha propuesto que el tipo y número de las misma puede ser usado como un indicador del tipo de enfermedad presente en el paciente (48), en este caso la cantidad de células que contiene un trasudado es menor a 1000 leucocitos/uL, contrastando con los exudados que presentan un mínimo de 5000 leucocitos/uL y que dependiendo de la cantidad de las mismas pueden ser asociados a las principales enfermedades que lo provocan, como se muestra en la tabla 4 (45). Así mismo las células en líquido pleural en estado fisiológico normal son de aproximadamente de 1500 células por microlitro con un predominio de 30-75% de monocitos, 3-70% células mesoteliales, 2-30% de linfocitos y 10% de neutrófilos (45-47).

Leucocitos/uL	Enfermedades
Menos de 1,000	Asociado a trasudado.
5,000-10,000	Exudado pleural.
10,000-50,000	Derrame paraneumónico.
Más de 50,000	Empiemas.

Cuando existe la sospecha de derrame pleural maligno (causado por neoplasias) se realiza un examen citológico del líquido pleural, sin embargo solo se logra identificar el 60% de los casos verdaderos positivos mediante esta técnica (45). El método diagnóstico del MPM considerado como el “estándar de oro” consiste en la obtención de muestra de tejido pleural, generalmente por una toracoscopia (46), la cual se procesa para obtener cortes histológicos a los cuales se realiza la detección de marcadores tisulares, usando la técnica de inmunohistoquímica. La técnica de inmunohistoquímica se basa en la detección de marcadores tisulares mediante anticuerpos específicos que reconocen a tales marcadores como su antígeno. En forma general, la técnica consiste en la adición de los anticuerpos marcados con una enzima al tejido, seguido por un tiempo de incubación

para permitir que los anticuerpos se unan a su antígeno si éste se encuentra presente. Sigue un lavado del tejido, con lo cual los anticuerpos que no encuentran a su antígeno son eliminados. A continuación, se agrega el sustrato de la enzima al tejido, de tal manera que si el anticuerpo-enzima están presentes se desarrolla un precipitado de color café que es el producto de la reacción enzimática. Esta coloración puede variar de intensidad de acuerdo al lote o clona del anticuerpo usado, además de la cantidad de marcadores que se encuentren en el tejido. El patólogo observa el tejido al microscopio y decide si la prueba es positiva o negativa basándose en su criterio y experiencia, por lo que el diagnóstico es subjetivo y cualitativo. Lo anterior puede ser causa de error o variabilidad en los resultados, y se adiciona a ello la disponibilidad (o no-disponibilidad) de los anticuerpos requeridos o bien el uso de diferentes lotes de anticuerpos. Para el diagnóstico del mesotelioma se recomienda el uso de al menos 2 marcadores positivos para el MPM y 2 marcadores negativos (49, 50); típicamente el MPM es positivo para la calretinina y citokeratina 5/6; pero negativo para Factor de transcripción tiroidea 1 (TTF-1) y el antígeno carcinoembrionario (CEA) (17, 51). Por otro lado, en el caso del diagnóstico del MPM epiteloide, el subtipo tubulopapilar y acinar puede ser difícil de distinguir del adenocarcinoma pulmonar (Adp) debido al patrón mesénquimal/epitelial que ambos presentan (20, 52). En este caso, el diagnóstico diferencial de MPM epiteloide y Adp requiere del uso de otro panel de anticuerpos en la tinción inmunohistoquímica los cuales sean positivos para MPM epiteloide como (49): Carletinina, que es una proteína de unión al calcio y que es expresada en las células mesoteliales reactivas y las células de MPM, tiene una tinción nuclear y citosólica (53) y Citoqueratina 5/6 que son una proteína que constituyen el citoesqueleto celular, y su expresión se encuentra únicamente en las células basales de los epitelios glandular y escamoso, mioepitelio, epitelio escamoso y mesotelio, lo cual es conservado durante la malignización y metástasis por lo que es posible reconocer inmunohistoquímicamente a los mesoteliomas (54, 55). Los marcadores positivos para el Adp son: CEA que es una glucoproteína que se encuentra distribuida por toda la superficie celular, en condiciones normales participa como molécula de adhesión, receptor molecular de superficie celular, regulador de la señal de transducción y como parte de la inmunidad innata (56); y el Ber-EP4 que es un anticuerpo monoclonal positivo para tejidos epiteliales, pero negativo para células mesoteliales (57) . El diagnóstico diferencial de ambas enfermedades es importante ya que el régimen de tratamiento es diferente para cada una de ellas (58).

Lo anterior implica que el diagnóstico del MPM es difícil, ya que conjunta varios factores como son la ausencia de síntomas específicos en etapas avanzadas de la enfermedad, el requerimiento del uso de técnicas invasivas para la obtención de tejido pleural que se usará para el diagnóstico histológico, y por último el uso de una técnica “estándar de oro” subjetiva y no-cuantitativa.

Para incrementar la probabilidad de un diagnóstico certero del MPM, la guía para el diagnóstico del MPM emitida por el “Grupo Internacional de Interés en MPM” recomienda que el diagnóstico se base en la interpretación del conjunto de los hallazgos clínicos, radiológicos y patológicos (inmunohistoquímica) (49).

Una alternativa sería el desarrollo de herramientas de diagnóstico cuantitativas, como puede ser la determinación cuantitativa de la expresión de MicroRNAs (miRNAs) mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real con transcriptasa inversa (RT-qPCR). La expresión de ciertos miRNAs ha sido asociada a la presencia de neoplasias por lo que se han señalado como biomarcadores potenciales de diagnóstico, son estables en las muestras biológicas donde se encuentran y son cuantificables, por lo que constituyen una alternativa prometedora (59).

IV. DEFINICIÓN Y BIOGÉNESIS DE LOS MIRNAS

Los miRNAs son ácido ribonucleico (ARN) no codificante de ~22 nucleótidos de origen endógeno que regulan la expresión genética a nivel post-transcripcional mediante el bloqueo de la traducción o la degradación de RNA mensajeros blancos específicos (mRNA) (60).

La biogénesis de los miRNAs inicia en el núcleo a través de la transcripción de los genes que codifican para los mismos mediante la acción de la ARN polimerasa II (Pol II), la cual genera los precursores llamados miRNA primarios o pri-miRNAs. El pri-miRNA presenta un tamaño de 60-100 nucleótidos (nt) con una estructura característica de “tallos-burbuja” o “hairpin”, que consiste en un tallo de 33-35 pares de bases con un bucle terminal y segmentos de RNA de cadena simple en el extremo 5´y 3´ (61). Los pri-miRNAs son procesados dentro del núcleo por el complejo enzimático Drosha-DGCR8 (62) que corta el pri-miRNA y genera el precursor pre-miRNA, caracterizado por un menor tamaño (~70 nt) (63, 64). Estos pre-miRNAs son exportados al citoplasma a través de la exportina-5-RanGTP. El pre-miRNA es posteriormente procesado en el citoplasma por la endonucleasa RNasa III conocida como DICER, la cual se une al pre-miRNA cerca del

bucle terminal para su corte y edición produciendo los miRNAs maduros de ~22nt (65), como se muestra en la figura 2.

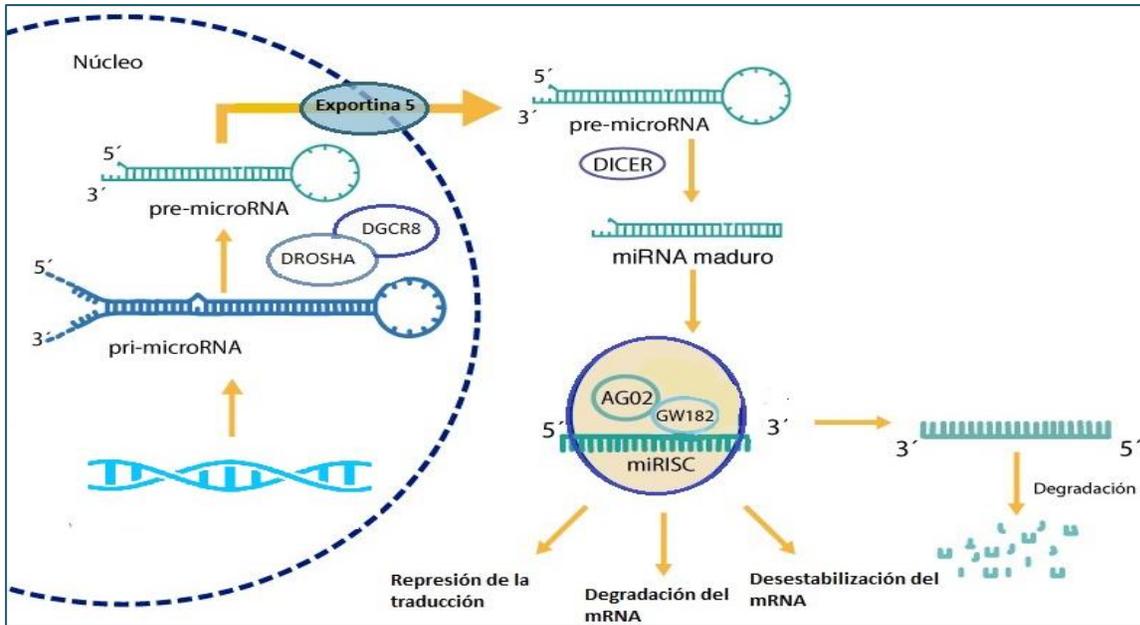


Figura 2. Biogénesis de miRNAs en la célula

A continuación, la proteína Argonauta (AGO), que forma parte del complejo de inducción al silenciamiento del RNA (RISC o miRISC) se une a los miRNAs maduros. En el complejo RISC, una hebra es retenida (hebra líder o guía) y la otra es eliminada (44). Esta hebra guía reconoce la región 3'UTR del mRNA de forma parcialmente complementaria, sin embargo, la unión debe presentar una perfecta complementariedad en una región de 2-8 nucleótidos llamada región semilla, localizada en el extremo 5' de los miRNAs (60, 66, 67). La unión del miRNA a su mRNA blanco induce que la traducción del mRNA blanco sea bloqueada mediante tres posibles mecanismos: represión de la traducción, degradación del mRNA y desestabilización del mRNA (68).

V. PROCESOS BIOLÓGICOS REGULADOS POR LOS MICRORNAS

Los miRNAs regulan de forma crucial múltiples procesos celulares tales como el ciclo celular, la diferenciación, la apoptosis, la proliferación, etcétera; por lo que constituyen un mecanismo conservado de regulación de la expresión genética (69).

La consecuencia biológica de la regulación genética de los miRNAs depende del blanco o blancos que regulen. Por ejemplo, si un miRNA reconoce como blanco a una o varias

citocinas pro-inflamatorias, entonces la expresión de ese miRNA promoverá un efecto anti-inflamatorio. Una característica relevante de los miRNAs es que funcionan como una red de regulación que puede afectar a vías de señalización completas, de manera que su efecto es relevante a nivel celular y biológico (70).

En concordancia con lo anterior, la función anormal de los miRNAs se ha asociado a múltiples patologías, incluyendo las enfermedades malignas como el cáncer de colon, pulmón, páncreas, entre otros (59, 71, 72). Adicional a lo anterior, en el cáncer los miRNAs alterados pueden funcionar como oncomiRs (similar a oncogenes) o bien como supresores de tumores dependiendo del blanco(s) que afecten. Los miRNAs que funcionan como oncomiRs pueden desencadenar la oncogénesis mediante la inhibición de genes supresores de tumores; mientras que los miRNAs que funcionan como supresores de tumores previenen el desarrollo tumoral mediante la inhibición de oncogenes tales como genes que controlan la proliferación (73). Un ejemplo, el oncomiR hsa-miR-21 se expresa altamente en varios tumores, incluyendo cáncer de mama, de ovario, colorectal, pulmonar y leucemia (74). Los blancos de miR-21 corresponden a genes supresores como PTEN y TPM1 (75).

Por otro lado, actualmente se conoce que los miRNAs son secretados por las células en condiciones fisiológicas de normalidad y patológicas. Estos miRNAs secretados son estables en el exterior celular además de tener la capacidad de ser incorporados a otras células receptoras conservando su funcionalidad. Las evidencias indican que los miRNAs secretados forman parte de un mecanismo de comunicación célula-célula, el cual depende del tipo, origen y condiciones fisiológicas de las células que los secretan (59, 76-78).

VI. MICRORNAS SECRETADOS

Los miRNAs también son detectados en sangre periférica y otros fluidos corporales tales como lágrimas, orina, saliva, etc. en individuos sanos en forma estables y a concentraciones constantes (79). De manera similar a los miRNAs tisulares, se han identificado además alteraciones en la expresión de los miRNAs secretados que han sido asociadas a diversas patologías, incluyendo en cáncer (79).

Mitchell y colaboradores (80) y Chen y colaboradores (81) demostraron por primera vez la existencia de miRNAs en suero y plasma de individuos sanos en concentraciones constantes y en forma estable. Estos miRNAs son resistentes a la acción de las RNAsas

endógenas de circulación, así como a condiciones externas como congelamiento-descongelamiento y pH extremos (76, 82, 83). Estas características son consideradas deseables en biomarcadores potenciales de diagnóstico debido al transporte, almacenaje y manipulación en el laboratorio a la que podrían ser sometidos. Alteraciones en la expresión de miRNAs específicos en circulación han sido asociadas al diagnóstico y prognosis de cáncer pulmonar, de ovario, de mama, de próstata, gástrico, colorectal entre otros (73).

Recientemente, se han encontrado evidencias de alteraciones en la expresión de miRNA en otros fluidos corporales que pueden ser asociados al diagnóstico de diversas neoplasias, tales como cáncer pancreático, cáncer pulmonar, glioblastoma, etc. (73).

Debido a que la obtención de sangre periférica y fluidos corporales es menos invasiva que la obtención de muestra de tejido, los miRNAs secretados son considerados como potenciales biomarcadores no-invasivos del cáncer.

Los miRNAs en circulación y fluidos corporales son secretados por las células a través de mecanismos específicos que dependen del tipo de célula, de su estado fisiológico y de las condiciones ambientales. Estas características confieren especificidad al tipo y concentración de los miRNAs secretados, de tal forma que su uso como biomarcadores específicos de diagnóstico es factible ya que su presencia y concentración dependerán de del tipo de células que secreten los miRNAs y de sus condiciones metabólicas y fisiológicas. Recordemos que las células tumorales presentan un metabolismo y otras características celulares diferentes a las células no malignas.

A la fecha se han descrito cuatro mecanismos de secreción de los miRNAs a) asociados a la proteína Ago2, b) dentro de exosomas, c) asociados a lipoproteínas de alta densidad (HDL) y d) asociados a la proteína Nucleofosmina 1 (NPM1) (67, 84, 85).

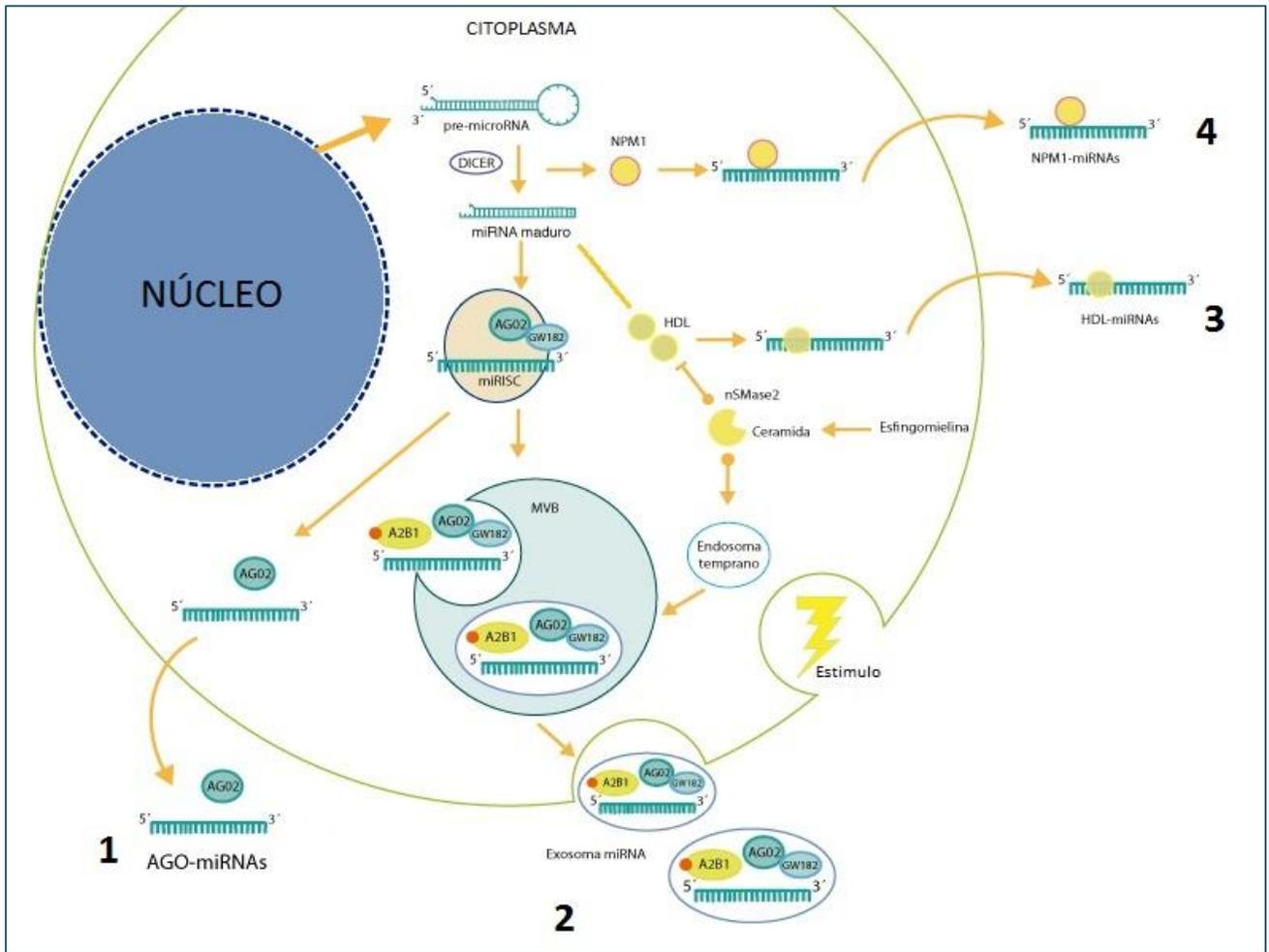


Figura 3. Mecanismos de secreción de los miRNAs. 1) Secreción de los miRNAs asociados a proteína Ago2. 2) Secreción de los miRNAs mediante exosomas. 3) Secreción de los miRNAs asociados a la proteína NPM1. 4) Secreción de los miRNAs asociados a HDL.

Ago2

Los miRNAs también pueden ser liberados fuera de vesículas (“libres de exosomas o exosome-free”) en asociación con la proteína Ago2 (76, 86), como se muestra en la Figura 3 (mecanismo #1). Arroyo y colaboradores (87) analizaron 128 miRNAs en plasma de individuos sanos y mediante pruebas de inmunoprecipitación e inmunotransferencia demostraron que el 66% de los miRNAs liberados estaban asociados a Ago2 y el 43% están asociados a las vesículas exosomales. Por otro lado, Turchinovich y colaboradores (84) analizaron 188 miRNAs en plasma sanguíneo y sobrenadante de cultivo celular, de los cuales 97 miRNAs se detectaron en ambas fracciones (exosomal y libre de

exosomas), 69 solo se encontraron en la fracción libre de exosomas y finalmente 22 de ellos se detectaron exclusivamente en exosomas. Posteriormente mediante inmunoensayos encontraron que los miRNAs libres de exosomas están asociados al complejo Ago (Figura 3 mecanismo 1).

Exosomas

Los exosomas son vesículas pequeñas (50-90 nm) de origen endocítico que se forman dentro de los cuerpos multivesiculares (MVBs), también conocidos como endosomas tardíos. Los exosomas están compuestos por colesterol, esfingolípidos, glicerofosfolípidos y ceramida, y son liberados de la célula por exocitosis al fusionarse con la membrana plasmática. La síntesis de exosomas inicia con la internalización de la membrana celular para producir los endosomas. Estos endosomas sufren invaginaciones que a su vez forman vesículas en el interior las cuales reciben el nombre de MVBs, los cuales al fusionarse con la membrana celular son liberados al medio extracelular y se convierten en exosomas (88). Los exosomas son capaces de unirse a células receptoras a través de interacciones receptor-ligando o endocitosis (89) y pueden contener mRNA funcional, miRNA y proteínas que son entregadas a dichas células. El proceso de síntesis de los exosomas requiere del “complejo endosomal de clasificación necesaria para el transporte” o complejo ESCRT, que reconoce proteínas de membranas ubiquitinadas y promueve su internalización en el MVB, así como de las proteínas asociadas como Alix, Gen de Susceptibilidad Tumoral 101 (TSG101), y tetraspanina (85, 90, 91). Se ha reportado que Ago2 desempeña un papel fundamental en la estabilización de miRNAs en células y en los MVBs secretados por células (86, 92, 93). El complejo GW182 también se ha encontrado en los MVBs y al igual que Ago2 se cree que podría estar relacionado con el funcionamiento de los miRNAs en la célula receptora, además de proteger a los miRNAs de la degradación mediante la unión a Ago2 (92, 94).

Un estudio realizado por Villarroya-Beltrú y colaboradores (95), demostró que la proteína hnRNPA2B1 también está presente en los exosomas, y además controla la carga de miRNAs a los MVBs. **La figura 3** muestra el mecanismo de secreción de miRNAs a través de exosomas (mecanismo #2).

Las células pueden secretar exosomas en respuesta a varios estímulos fisiológicos o fisiopatológicos (93). El mecanismo de comunicación intercelular mediado por los exosomas es particularmente importante en el cáncer, ya que las células tumorales secretan exosomas, que puede dirigirse a las células adyacentes del mismo tipo (“efecto

autocrino”), a las células cercanas de diferentes estirpes (“efecto paracrino”), o incluso llegar a las células localizadas en órganos distantes. Estos exosomas pueden ser los responsables en la modulación de la respuesta inmune contra el tumor, la inducción de la angiogénesis, la invasión de células y la metástasis tumoral (96).

Nucleofosmina 1 (NPM1)

Un solo estudio, realizado por Wang y colaboradores (97) demostró que miRNAs en el medio cultivo de fibroblastos de pulmón estaban asociados a 12 proteínas de unión al RNA, entre ellos la proteína NPM1, que es una proteína de unión al ARN nuclear, que funciona como exportador al ribosoma usando técnicas de espectrometría de masas e inmunoprecipitación. Adicionalmente, mediante ensayos de digestión con RNasas se demostró que NPM1 protege a los miRNAs sintéticos de la degradación enzimática. El estudio concluyó que el NPM1 puede estar implicado tanto en el proceso de exportación de miRNA como en la protección de los miRNAs fuera de la célula.

Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

En el 2010 Vickers y colaboradores (98), reportaron el hallazgo de miRNAs asociados a HDL en el plasma de individuos sanos y pacientes con hipercolesterolemia y arterioesclerosis. Adicionalmente, se reportó que miRNAs asociados a HDL y purificados de plasma humano, pudieron ser transferidos a hepatocitos cultivados (línea celular Huh7).

Así mismo, Wagner y colaboradores (99) reportaron la presencia de miRNAs en la fracción purificada de HDL proveniente de plasma de pacientes con enfermedad arteriocoronaria estable, síndrome coronario e individuos sanos.

Kosaka y colaboradores (90) encontraron que al aumentar nSMase2 y la biosíntesis de la ceramida, también incrementaba la exportación de miR-16 y miR-146a exógenos, mientras que sus niveles de expresión celulares se mantuvieron sin cambios, en células de riñón de embrión humano (HEK293). Al igual que Vickers y colaboradores (98) que también sugieren que nSMase2 y la vía de la ceramida reprimen la exportación de los miRNA por los HDL.

VII. MICRORNA COMO BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO EN NEOPLASIAS

Un biomarcador es un indicador cuantificable de un estado biológico específico que puede ser de origen químico, físico o biológico (100). Para que un biomarcador pueda ser útil en el ámbito clínico debe de cumplir con las siguientes características: ser cuantificable y reproducible; especificidad y sensibilidad tener un buen rendimiento de pruebas (con un buen valor predictivo positivo y valor predictivo negativo); se debe poder medir a partir de material accesible, en pequeñas cantidades y con poca preparación, así como indicar el estadio de la enfermedad (101).

Los miRNAs son cuantificables, relativamente estable en las muestras biológicas y el tipo de miRNA y su concentración dependen del tipo de células que lo produzca. Actualmente existen evidencias de que los miRNAs son biomarcadores potenciales de diagnóstico de cáncer de colon, mama, pulmonar, glioblastoma, colorectal y pancreático entre otros (71, 102-107).

Por ejemplo Komatsun y colaboradores en el 2011 (103), analizaron 3 miRNAs oncogénicos (hsa-miR-21, hsa-miR-184, hsa-miR-221) y un miRNA supresor de tumores (hsa-miR-375) en plasma de 50 pacientes con carcinoma de células escamosas y 20 de sujetos sanos. Los miRNAs se cuantificaron mediante TaqMan (Applied Biosystems) en 20 muestras de plasma pacientes con carcinoma de células escamosas y 10 de sujetos sanos. Los resultados indicaron que el nivel de miR-21 fue significativamente mayor y el de miR-375 fue significativamente menor en las muestras de pacientes con carcinoma de células escamosas comparadas con individuos sanos. Posteriormente se evaluó la concentración de miR-21 y miR-375 en 14 muestras de tejido de pacientes con carcinoma de células escamosas que expresaron niveles de miR-21 y miR-375 elevados en plasma y 8 muestras de tejido de pacientes con carcinoma de células escamosas que expresaron niveles de miR-21 y miR-375 bajos en plasma. La concentración de miR-21 fue elevada en las 11 muestras de tejido de pacientes y la concentración de miR-375 fue baja en solo 4 de las 8 muestras de tejido de pacientes con carcinoma de células escamosas, comparadas con los controles sanos. Posteriormente se analizaron las concentraciones de miR-21 en muestras de plasma pre y postoperatorias de ocho pacientes con carcinoma de células escamosas sometidos a esofagectomía curativa. Las concentraciones de miR-21 plasmático se redujeron significativamente en muestras postoperatorias en comparación con los niveles en las muestras preoperatoria. Finalmente los autores

realizaron la validación de miR-21 y miR-375 en 50 muestras de plasma de pacientes con carcinoma de células escamosas y 20 muestras de plasma de sujetos sanos mediante las pruebas de ROC y AUC donde los resultados encontrados fueron 0,618 y 0,807 respectivamente.

Chen y colaboradores en el 2016 (104) analizaron el valor diagnóstico de miR-21 y miR-152 en 591 muestras de plasma de pacientes con estadios tempranos de cáncer de mama (n=53), próstata (n=65), pulmón (n=55) y carcinoma colorectal (n=31); además en pacientes con enfermedades benignas en mama (n=40), pulmón (n=35), próstata (n=51) y colorectal (n=33); así como en sujetos sanos(n=228). Mediante RT-qPCR, se encontró una sobreexpresión de miR-21 y miR152 en los pacientes con cáncer de pulmón, cáncer de mama y carcinoma colorectal comparados con los sujetos sanos. Así mismo, los autores reportan una sobreexpresión significativa de miR-21 y miR-152 en pacientes con enfermedades benignas de pulmón y mama comparado con controles sanos. Finalmente realizaron el análisis de ROC y AUC donde miR-21 tuvo un AUC de 0.701 para el cáncer de pulmón y un AUC de 0.613 para Cáncer de mama. El AUC de miR-152 fue de 0.701 para el cáncer de pulmón, AUC de 0.687 para el cáncer de mama y un AUC de 0.539 para el carcinoma colorectal. Los autores concluyen que miR-21 y miR-152 pueden servir como biomarcadores en plasma para la detección del cáncer de pulmón, cáncer de mama y carcinoma colorectal.

También, Saaman y colaboradores en el 2016 (94), analizaron la expresión de miR-210 en tejido de 276 casos de pacientes con carcinoma renal de células claras (ccRCC) y 40 pares de tejido de individuos sanos. Se evaluó la expresión de miR-210 en tumores primarios y metastásicos, así como los diferentes subtipos de carcinomas renales, sin embargo, no se encontró una asociación significativa entre la expresión de miR-210 y el tamaño del tumor, el estadio o el grado; también relacionaron la sobre expresión de miR-210 con la baja supervivencia global. Así mismo encontraron que la expresión de miR-210 fue significativamente mayor en ccRCC que en riñón normal, lo cual podría hacer a miR-210 un biomarcador para ccRCC.

VIII. MIRNAS COMO BIOMARCADORES DE DIAGNOSTICO DEL MPM

En líneas celulares (Tabla 5)

- i. Bussaca y colaboradores en el año 2010 (108) analizaron la expresión de miRNAs en dos líneas celulares de MPM subtipo epiteloide (MPP-89 y REN) así como en la

línea celular inmortalizada de mesotelio normal (HMC-TERT), mediante la técnica de microarreglos (miRCURY LNA microarray kit, Exigon). Se encontraron 65 miRNAs diferencialmente expresados entre ambas líneas celulares de MPM comparadas con la línea celular de mesotelio normal, de los cuales 10 fueron validados mediante PCR en tiempo real (qPCR) siendo seis miRNAs sobre-expresados (hsa-miR-17-5p, hsa-miR-143, hsa-miR-30c, hsa-miR-106a, hsa-miR-30e-5p y hsa-miR-21) y cuatro sub-expresados (hsa-miR-29a, hsa-miR-31, hsa-miR-222 y hsa-miR-221). Sólo el hsa-miR-21 mostró datos opuestos al microarreglo. A continuación, se analizaron la expresión de los 10 miRNAs identificados anteriormente en 24 muestras de tejido pleural de pacientes con MPM (3 tipos histológicos) mediante RT-qPCR y concluyeron que cada tipo histológico podía ser diferenciado entre sí mediante el patrón de expresión de siete miRNAs (hsa-miR-17-5p, hsa-miR-21, hsa-miR-29a, hsa-miR-30c, hsa-miR-30e-5p, hsa-miR-106a y hsa-miR-143). Respecto a lo anterior, podemos mencionar que dicho trabajo científico tiene la desventaja de emplear líneas celulares en contraste del empleo de tejido tumoral o células de tumor primario en fresco, así como del número limitado de dos líneas de MPM versus una línea celular normal) para la identificación inicial de los miRNAs de interés para el diagnóstico de MPM.

- ii. Por su parte, Balatti y colaboradores (109) analizaron la expresión de miRNAs en cinco líneas celulares obtenidas de pacientes con MPM (MSTO 211H, MPP-89, IST-MES2, NCI-H2052 Y NCI-H28) y cinco líneas celulares provenientes de cultivos primarios de mesotelio pleural normal (4N, 6N, 13N, 16N y 26N), mediante la técnica de microarreglos (Agilent Technologies, Human miRNA microarrays G4470A). Al respecto, 14 miRNAs se encontraron sobre-expresados mientras que ocho miRNAs se encontraron sub-expresados en las líneas celulares de MPM comparadas con líneas celulares de mesotelio pleural normal. Los ensayos de validación por RT-qPCR demostraron que miR-17-5p, miR-20a, y miR-92 fueron detectados sobre-expresados mientras que miR-497 estaba sub-expresado. Así mismo la sobre-expresión de miR-17-5p (RT-qPCR) y miR-20a (microarreglo) fueron consistentes con los resultados reportados por Bussaca en el año 2010. En este trabajo se enfatiza que los miembros de la familia miR-17-92 se asocia con oncogénesis, y sugieren que la sub-expresión de p21 (un oncogen) encontrada en 5 líneas de MPM (analizada por Western Blot) se debe a la sobre-expresión del miR-17-5p. Esta asociación es indirecta, y el trabajo no proporciona evidencia de

tal relación, sin embargo, de confirmarse dicho hallazgo señalaría al miR-17-5p como un biomarcador potencial del MPM al encontrarse asociado con el proceso de oncogénesis. No obstante, una desventaja de este trabajo es que se limita al análisis representativo de líneas celulares, mientras que no explora la expresión de dichos miRNAs en muestras de tejido o bien muestras de tumor primario en fresco.

En tejido pleural (Tabla 5)

- i. Entre los primeros grupo de investigación en profundizar en el análisis de los miRNAs de manera directa sobre muestras de tejido de MPM fueron el grupo de Benjamin y colaboradores, en el 2010 (110). En este estudio se utilizaron muestras de tejido pleural fijado en FFPE diagnosticados con MPM y en muestras de tejido diagnosticados con diversos tipos de carcinomas de origen epitelial (pulmón, riñón, vejiga, entre otros). El objetivo fue identificar biomarcadores miRNAs que pudieran diferenciar al MPM de los carcinomas analizados. El estudio se dividió en 3 fases: La fase de descubrimiento en el que se identificaron los marcadores potenciales, una fase de entrenamiento en el que se estableció un protocolo de diagnóstico que utiliza los marcadores seleccionados, y una fase de validación en el que el protocolo de diagnóstico fue probado en una cohorte independiente. Para la primera fase se utilizaron 7 muestras de MPM y 97 de carcinoma de tipo epitelioide y la técnica de microarreglos. Se encontraron 11 miRNAs con diferencias significativas entre ambos grupos, 7 sobre- expresadas en los carcinomas (hsa-miR-200a, hsa-miR200b, hsa-miR-200c, hsa-miR-141, hsa-miR-429, hsa-miR192 y hsa-miR-194) y 4 sobre-expresados en MPM (hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b y hsa-miR-152). La mayor diferencia entre MPM y los carcinomas fue con hsa-miR-200c y hsa-miR-141, sin embargo la diferencia fue menor en el Carcinoma de células renales (RCC), por lo que posteriormente las muestras se clasificaron en no-RCC y RCC. Con esta clasificación, los resultados indicaron que la expresión de hsa-miR-200c estaba baja en MPM y elevada en no-RCC, la expresión de hsa-miR-192 fue baja en MPM y elevada en RCC y la expresión de hsa-miR-193a-3p fue alta en MPM pero baja en RCC y no-RCC. Estos datos se validaron por RT-qPCR en un grupo de muestras de 22 MPM y 43 carcinomas, mostrando los mismos resultados. La segunda fase consistió en la determinación por RT-qPCR de los niveles de

expresión de hsa-miR-200c, hsa-miR-193a-3p y hsa-miR-192 en 32 muestras de tejido pleural de MPM y 113 muestras de tejido de diversos carcinomas. Se reportó que la medición combinada de dos miRNAs (hsa-miR-200c y hsa-miR-193a-3p) puede usarse para distinguir entre MPM y la mayoría de los no-RCC, mientras que la sola medición del hsa-miR-192 puede distinguir el MPM de los RCC. De las muestras anteriores, se usaron 16 de MPM y 23 de carcinomas para establecer límites de medición en cuantificación relativa de los miRNAs por RT-qPCR que pudieran ser usados para distinguir al MPM de carcinomas no-MPMS estableció la medida llamada "SCORE" donde el "score 1" se basaba en la expresión normalizada de hsa-miR-192 de -8.05, y "score" 2 basado en la relación lineal de la expresión normalizadas de hsa-miR-200c y hsa-miR-193a-3p de -1.5 y +6.6. Finalmente en la tercera etapa se realizó un estudio ciego de 63 muestras de tejido pleural y de pulmón (14 MPM y 49 carcinomas no-MPM). Los datos indicaron que las 14 muestras de MPM fueron identificadas correctamente (sensibilidad 100%), 46 de los 49 carcinomas fueron identificados correctamente (especificidad del 94%). De estas últimas, todos los adenocarcinomas (16 muestras) fueron identificadas correctamente. Este es el primer estudio que proporciona una propuesta para la determinación cuantitativa de miRNAs como biomarcadores del MPM vs. otros carcinomas de origen epitelial, aún cuando el número de muestras analizadas puede considerarse limitado. Desafortunadamente los autores no publicaron otro artículo de seguimiento para probar el poder diagnóstico de los miRNAs propuestos en un mayor número de muestras o en una población abierta.

- ii. También en el 2010, Gee y colaboradores (111) buscaron biomarcadores potenciales de diagnóstico diferencial entre el MPM y el Adp. En este estudio primero se analizaron los miRNAs en 15 muestras de tejido con diagnóstico de MPM y 10 muestras con diagnóstico de Adp, mediante la técnica de microarreglos (Affimetrix). El estudio reportó la sub-expresión de siete miRNAs en MPM comparado con Adp (hsa-miR-200a, hsa-miR-200c, hsa-miR-200b, hsa-miR-203, hsa-miR-141, hsa-miR-429 y hsa-miR-205). Estos miRNAs se cuantificaron posteriormente por RT-qPCR en 100 muestras de tejido de MPM (37 MPM no caracterizado, 39 MPM epiteloides, 19 MPM bifásico y 10 MPM sarcomatoides) y 32 muestras de tejido de Adp. Los resultados confirmaron la sub-expresión de hsa-miR-200c, hsa-miR-200b, hsa-miR-203, hsa-miR-141, hsa-miR-429 y hsa-miR-205

en MPM comparado con el Adp, sin asociación con el subtipo histológico. Los resultados obtenidos mediante curvas de ROC indicaron que los 7 miRNAs discriminan a ambas neoplasias, con una sensibilidad o bien una especificidad mayor al 80%. Se reportó que cuatro de los miembros de la familia de los hsa-miR-200 (hsa-miR-200c, hsa-miR-200b hsa-miR-141, hsa-miR-429) presentaron la mejor capacidad para discriminar el MPM del Adp, sin embargo sólo el hsa-miR-200c, hsa-miR-200b hsa-miR-141 mostraron ambos parámetros (sensibilidad y especificidad) con valor mayor al 80%. Cabe mencionar que Benjamin y colaboradores en el 2010 (110) también reportaron la sub-expresión del hsa-miR-200c en muestras de tejido de MPM (comparadas con diversos carcinomas). La relevancia de este trabajo consiste en que el diagnóstico histopatológico diferencial de estas neoplasias (MPM epiteloide vs. Adp que invade pleura) suele confundirse con frecuencia.

- iii. Por otro lado, Pass y colaboradores en el 2010 (112) buscaron identificar biomarcadores miRNAs asociados a la prognosis del MPM. En este trabajo se basaron en estudios estadísticos previos que indicaban que el tiempo de progresión después de la cirugía o TTP (“time to progression from surgery”) y la sobrevivencia eran de 8 a 12 meses y de 12 a 20 meses respectivamente en los casos de MPM. Los pacientes con “buena” prognosis eran aquéllos con una TTP \geq 12 meses o una sobrevivencia \geq 15 meses. Basado en lo anterior, se analizaron los miRNAs en muestras de tejido pleural congelado de MPM en dos grupos de estudio llamados “training set” (10 TTP \geq 12 meses y 24 TTP $<$ 12) y “test set” (33 TTP \geq 12 meses y 50 TTP $<$ 12) mediante la técnica de microarreglos (Nexterion, Slide E, Schott, Mainz, Germany). Los resultados indicaron que la sobre-expresión del hsa-miR-29c se asocia a una “buena” prognosis usando la media de la expresión del hsa-miR-29c (8.8) como valor de corte. En el “training set” se encontró que el valor de corte distingue dos grupos de pacientes: con una TTP de 4 meses vs. 14 meses, y con una sobrevivencia de 8 meses vs. 32 meses. El “test set” consistió en dos grupos de pacientes: con una TTP de 5.5 meses vs. 12.8 meses y sobrevivencia de 9.1 meses vs. 21.6 meses. En este estudio, la sobre-expresión y asociación del hsa-miR-29c con “buena” prognosis fue validada por RT-qPCR en sólo 16 muestras de MPM (8 con “buena” prognosis” y 8 con “mala” prognosis) provenientes del “training test”.

- iv. Santarelli y colaboradores, en el 2011 (113), analizaron 88 miRNAs (asociados a carcinogénesis en la literatura) en 10 muestras de tejido pleural fresco (conservado en RNA-Later) con diagnóstico de MPM y una muestra representativa proveniente de tejido pleural fresco de 5 individuos “sanos”. Lo anterior mediante un PCRArray. Los datos indicaron una sub-expresión de hsa-miR-335, hsa-miR-130a, hsa-miR-193b, hsa-miR-30c, hsa-miR-212, hsa-miR-126, hsa-miR-32 y hsa-miR-181c en las muestras de MPM. Posteriormente se utilizaron 54 muestras de tejido en FFPE (27 MPM y 27 de tejido no-canceroso adyacente) para cuantificar el miR-335, miR-126 y miR-32 mediante RT-qPCR. Mediante el análisis con curvas de ROC encontraron que sólo hsa-miR-126 y hsa-miR-32 presentaron una diferencia significativa entre las muestras de MPM y sus controles, con una precisión (“accuracy”) de 70% y 65 % respectivamente. Cabe mencionar que hay estudios que demuestran que el perfil de miRNAs detectado en muestras congeladas puede variar con respecto al perfil detectado en muestras de FFPE, y que se debe probablemente a la degradación de ciertos miRNAs que depende del método de conservación usado (114).
- v. Andersen y colaboradores en el 2012 (115) reportaron un estudio cuyo objetivo era verificar si los miRNAs hsa-miR-17-5p, hsa-miR-30c, hsa-miR-221 y hsa-miR-222 (reportados como alterados en MPM por estudios previos) eran útiles para diferenciar el MPM de tejido con proliferación reactiva mesotelial (RMP). En este estudio se utilizaron muestras de tejido de MPM epiteloide (n=13) y tejido adyacente no-tumoral (n=13) conservado en FFPE de pacientes con 1-3 ciclos de quimioterapia. En este trabajo no se describe la histopatología de las muestras de tejido no-tumorales analizadas, sin embargo, declaran que sus datos son el resultado de la comparación de tejido con MPM vs. RMP. Los resultados del RT-qPCR (Applied Biosystems) demostraron la sub-expresión del hsa-miR-17-5p y la sobre-expresión de hsa-miR-221 en MPM. En este trabajo se declara que sus resultados no se deben al tratamiento con quimioterapia, ya que “compararon la expresión de dichos miRNAs en muestras de tejido congeladas de 6 pacientes con diagnóstico-compatible (*matched diagnosis*) colectadas previo al tratamiento, y los resultados no difirieron de forma significativa”. Sin embargo, no describen si las muestras provienen de los mismos 13 pacientes del primer análisis o no, si usaron esta vez muestras no-tumorales como control de comparación, ni cómo realizaron dicha comparación. Los resultados de este estudio difieren de los reportados por

- Bussaca, colaboradores (108) y Balatti, colaboradores (109) donde el hsa-miR-17-5p fue sobre-expresado y hsa-miR-221 fue sub-expresado en MPM.
- vi. En el 2014, Cioce y colaboradores (116) realizaron una prueba de tamizaje (887 miRNAs) en tejido pleural de MPM (n=29) *versus* tejido de quistes mesoteliales peritoneal (n=12) de muestras conservadas en FFPE mediante microarreglos (Human miRNA Microarray V2 Rel.16 Agilent). De los 19 miRNAs con expresión diferencial en MPM vs quistes mesoteliales, el hsa-miR-145 presentó una sub-expresión con alta significacnca en MPM, por lo que fue elegido para estudios posteriores. La sub-expresión de este miRNA se validó mediante RT-qPCR primero en muestras de tejido pleural fresco de MPM (n=6) y tejido normal (n=14) y posteriormente en muestras congeladas de tejido pleural con MPM (n=36) y tejido mesotelial peritoneal normal (n=36, mismo paciente). Prosiguieron con el análisis de la posible función del hsa-miR-145 mediante estudios *in vitro* e *in vivo*. Los resultados de la expresión inducida del hsa-miR-145 (transfección de “mimic” miRNA) en tres líneas celulares de MPM (MSTO-211H, NCI-H2052 y NCI-H28) y una de mesotelio normal (HMC) mostraron la reducción de la proliferación y migración de dos de las líneas de MPM comparadas con el control. El xenotransplante de células MSTO-211H (transfectadas con mimic-145) en ratones SCID demostró una inhibición significativa del crecimiento tumoral en 6 de 8 ratones. El problema con este último estudio *in vivo* es que se menciona haber analizado sólo 8 ratones, sin réplicas experimentales o determinaciones independientes, lo cual minimiza la validez de las conclusiones basadas en dicho estudio. Se concluye que los resultados sugieren que el hsa-miR-145 funciona como supresor de tumores. Aunque el estudio no se enfocan en el análisis del valor diagnóstico del hsa-miR-145 en MPM, incluimos este artículo en la revisión debido a que la probable asociación del miRNA con el proceso carcinogénico incrementa la probablilidad de que éste pudiera presentar un valor diagnóstico para la enfermedad. Por lo anterior, este estudio podría servir de base para estudios posteriores que verifiquen los datos reportados y/o analizen el valor diagnóstico potencial del hsa-miR-145. Un dato adicional es que este estudio reportó además la sub-expresión de hsa-miR-141 y hsa-miR-200c, lo cual coincide con lo reportado por Gee, et al, 2011 (111) y Benjamin, et al, 2010 (110).
- vii. Ramírez-Salazar y colaboradores 2014 (117) analizaron los miRNAs expresados en tejido pleural consevados en FFPE diagnosticados con MPM, paquipleuritis e

hiperplasia atípica mesotelial además de tejido no-canceroso y no-inflamatorio como control, mediante PCRArray (TaqMan Array, Applied Biosystems, CA, USA). El objetivo fue elucidar mecanismos asociados al desarrollo del MPM, ya que la inflamación crónica de la pleura es considerada como factor detonante en la patogénesis de esta enfermedad. El razonamiento fue que los miRNAs involucrados en la patogénesis del MPM podrían ser blancos terapéuticos y diagnósticos potenciales. Se reportaron 19 miRNAs expresados diferencialmente en las muestras de MPM comparadas con las muestras control, 11 fueron sub-expresados (hsa-miR517v-3p, hsa-miR-627, hsa-miR-766-3p, hsa-miR-101-3p, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-212-3p, hsa-miR-596, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-671-3p y hsa-miR-181a-5p) y ocho fueron sobre-expresados (hsa-miR-30e-3p, hsa-miR-34a-3p, hsa-miR-622, hsa-let-7a-5p, hsa-miR-196b-5p, hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-18a-5p y hsa-miR-302-3p). Las muestras de MPM e inflamación crónica comparten los siguientes miRNAs: hsa-miR-101-3p y hsa-miR-34a-3p sobre-expresados y a hsa-miR-18a-3p sub expresado. Las muestras de MPM e hiperplasia comparten únicamente la sobre-expresión de hsa-miR-30e3p, hsa-miR-26a-2-3p y hsa-miR-196b-5p. Posteriormente, se predijeron las vías biológicas enriquecidas por los blancos de los miRNAs de interés (análisis bioinformático) y encontraron que los miRNAs sub-expresados hsa-miR-101, hsa-miR-212, hsa-miR-145, y hsa-miR-181-3p y los miRNAs sobre-expresados hsa-miR-622, hsa-let-7g-5p, hsa-miR-18a-5p, y hsa-miR-30e-3p fueron asociados a las "vías en cáncer" significativamente. Por otra parte también la "vía de señalización de TGF-beta" (dirigido por los miRNAs sub expresados hsa-miR-212-3p, hsa-miR-145-5p, and hsa-miR-181a-5p; y los miRNAs sobre-expresados hsa-let-7g-5p, hsa-miR302b-3p hsa-miR 135b-5p) es una vía pro-inflamatoria asociada al desarrollo de MPM así como la via de señalización " mitogen-activated protein kinase (MAPK)" (dirigida por la sobre-expresión de let-7g-5p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-302b-3p y hsa-miR-135b-5p) que esta relacionada con carcinogenesis. La sub-expresión de hsa-miR-145 fue reportada también en MPM por Cioce y colaboradores en ese mismo año (116), y aunque la sub-expresión de hsa-miR-101 y hsa-miR-212 no haya sido reportada en MPM aún, éstos se encontraron sub-expresados en carcinoma hepatocelular, cáncer pulmonar y de próstata y han sido asociados a la función de supresor de tumores (118-120).

viii. Andersen y colaboradores, (121) en este nuevo trabajo del 2014, buscaron identificar candidatos miRNAs para biomarcadores de diagnóstico, mediante el análisis de los miRNAs en muestras conservadas en FFPE de tejido pleural con MPM (pacientes con quimioterapia), en tejido pleural con MPM de biopsia preoperatoria (pacientes sin quimioterapia) (DB) y tejido mesotelial sano adyacente de paciente con MPM (con quimioterapia) (NNP). Se realizó una prueba de tamizaje por PCR Array (miRCURY LNA Universal RT microRNA Ready-to-Use, PCR, Human Panels I+ II versión 2.M) y dos validaciones por RT-qPCR individual. Es importante señalar algunos detalles confusos del diseño en este estudio. Primero, se describe que las muestras analizadas en el tamizaje y primer validación por RT-qPCR contenían de 40-85% de tejido neoplásico. Además de la gran heterogeneidad en el contenido de tejido neoplásico, no se aclara cuántas muestras contenían 40% y cuántas muestras contenían 85% u otro porcentaje. Lo anterior es importante si consideramos la representatividad de la comparación de una muestra cuyo contenido no-neoplásico es 60% *versus* una muestra cuyo contenido no-neoplásico es menor al 15%. Otro dato confuso implica muestras de tejido con MPM previo al tratamiento con quimioterapia se incluyeron para verificar si existe una variación en la expresión de miRNAs debido a la misma. Sin embargo, en el texto se explica que la expresión diferencial de los miRNAs en MPM se determinó por comparación con tejido sano adyacente CON QUIMIOTERAPIA, por lo cual no es posible tal análisis. En la tabla 2 se presentan los resultados de la comparación de la expresión de sólo seis miRNAs (RT-qPCR) en DB vs MPM, sin embargo no mencionan alguna relación con lo anterior en el texto. Por otro lado, en este estudio se reportan miRNAs diferencialmente expresados con una “casi significancia” estadística ($0.05 \leq p \leq 0.1$), lo cual es confuso porque generalmente se consideran relevantes sólo aquéllos hallazgos con significancia estadística (cualquiera que sea el valor de p que el autor considere como con significancia). De los miRNAs reportados como diferencialmente expresados se escogieron los dos que estaban significativamente sub-expresados en ambos grupos de comparación MPM vs NNP y DB vs NNP (hsa-miR-126 y hsa-miR-652), así como dos miRNAs sub-expresados sólo en DB vs NNP (hsa-miR-145 y hsa-miR-143, los cuales se asocian con la vía de regulación p53/MDM2) para la validación por RT-qPCR individual. En esta ocasión, los resultados indicaron una sub-expresión estadísticamente significativa

de hsa-miR-126, hsa-miR-652, hsa-miR-145 y hsa-miR-143 en ambos DB y MMP comparados con NNP. Se reportó que el hsa-miR-145 y hsa-miR-652 presentan una sensibilidad o especificidad >0.8 , mientras que el hsa-miR-143 y hsa-miR-126 <0.8 (curvas ROC).

- ix. Cappelleso y colaboradores (2015) (122) buscaron identificar miRNAs que pudieran ser usados como biomarcadores de diagnóstico complementario del MPM en muestras citológicas de derrame pleural. Para ello escogieron 15 miRNAs reportados en tres estudios previos como candidatos potenciales y los cuantificaron por RT-qPCR primero en líneas celulares, después en muestras de tejido conservado en FFPE y finalmente en muestras citológicas de derrame pleural. Los 15 miRNAs analizados fueron hsa-miR-17, hsa-miR-18a, hsa-miR-18b, hsa-miR-19a, hsa-miR-19b, hsa-miR-20a, hsa-miR-20b, hsa-miR-21, hsa-miR-25, hsa-miR-92, hsa-miR-93, hsa-miR-106a, hsa-miR-106b, hsa-miR-126 y hsa-miR-145. Dos líneas celulares de MPM (H2052 y H28) y una de mesotelio normal (MET-5A) se utilizaron en este estudio; y encontraron la sobre-expresión de hsa-miR-19a, hsa-miR-19b, hsa-miR-21 y hsa-miR-25; y una sub-expresión en hsa-miR-126. Posteriormente estos 5 miRNAs fueron cuantificados nuevamente en muestras de tejido pleural conservado en FFPE (51 MPM, 40 benignas/ "pleura reactiva") obteniendo los mismos resultados que en las líneas celulares con un "fold change" >1.5 . Así mismo estos 5 miRNAs fueron evaluados en 29 muestras citológicas de MPM y 24 muestras citológicas con células mesoteliales reactivas (RMC o *reactive mesothelial cells*). Se indicó que 31 muestras secadas al aire y teñidas con May-Grunwald-Giemsa y 22 muestras fueron fijadas en alcohol al 95% y teñidas con Papanicolaou, pero no aclaran qué tipo de muestras. Los resultados obtenidos fueron una sobre-expresión de miR-19a, miR-19b, y miR-21; y una sub-expresión de miR-126. Se determinó el poder diagnóstico de estos miRNAs en las muestras citológicas mediante ROC, AUC y el análisis de regresión logística. hsa-miR-21 y hsa-miR-126 tuvieron una precisión moderada (AUC de 0.79 y 0.71 respectivamente). Se sugiere que el hsa-miR-19a, hsa-miR-19b, hsa-miR-21 y hsa-miR-126 podría ser marcadores de diagnóstico de MPM en muestras citológicas, porque mostraron una sensibilidad o especificidad > 0.80 . hsa-miR-21 y miR-126 fueron los mejores miRNAs diagnósticos para MPM (con una constante de regresión de 20,33 y 0,09, respectivamente). Un detalle que llama la atención es que se reporta por primera vez la determinación de miRNAs en muestras

citológicas teñidas. Los resultados muestran que los 5 miRNAs analizados en dichas muestras son detectables; sin embargo, cuando los autores declaran que “la fijación, tinción y tiempo de conservación de las muestras no afectan “*marcadamente*” la calidad y cantidad del RNA obtenido”, éstos no proporcionan evidencias o datos experimentales que respalden esa declaración. Además, las muestras citológicas usadas fueron teñidas con diferentes técnicas y hasta la fecha no hay evidencias reportadas de la afectación de las diferentes tinciones en los miRNAs detectados. Es conocido que el RNA > 100 nt extraído de muestras conservadas en FFPE se encuentra degradado, mientras que la mayoría de los miRNAs se preservan, sin embargo ciertos miRNAs ya no son detectados dependiendo del tiempo de conservación (114).

- x. Ak y colaboradores (2015) (94) (123) En este estudio, se investigaron los niveles de expresión de los miRNAs y mRNA en muestras de tejido pleural congelado de MPM y de pacientes con derrame pleural benigno asociado a asbesto (BAPE). Las muestras de tejido BAPE presentan pleuritis/fibrosis no específica. Se cuantificaron los miRNAs por PCR Array (Applied Biosystems) en 18 muestras con MPM (1 paciente con tratamiento multimodal, 10 pacientes con quimioterapia y 7 con tratamiento paliativo) y 6 muestras con BAPE. Once miRNAs estaban sobreexpresados en MPM en comparación con las muestras de BAPE (hsa-miR-484, hsa-miR-320, hsa-let-7a, hsa-miR-744, hsa-miR-20a, hsa-miR-193b, hsa-let-7d, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-92a, hsa-miR-155, y hsa-miR-152). El análisis de ROC y AUC de los datos anteriores mostró que 4 de los 11 microRNAs (hsa-miR-484, hsa-miR-320, hsa-let-7a y hsa-miR-125a-5p) tuvieron ≥ 0.90 AUC. Por lo que hsa-miR-484 tuvo una sensibilidad y especificidad del 100%, hsa-miR-320 tuvo una sensibilidad 78% y una especificidad de 100%, hsa-let-7a una sensibilidad del 94% y especificidad del 83% y hsa-miR-125a-5p con una sensibilidad de 89% y especificidad del 100%. Así mismo se reportó que no hubo una asociación significativa entre el tipo histológico del tumor y la expresión de los miRNAs. Otro dato importante es que la sobreexpresión de hsa-miR-20a coincide con los resultados de Balatti y colaboradores en el 2011 (91).

En sangre periférica (Tabla 5)

Los miRNAs tisulares poseen un gran potencial de diagnóstico para diversos tumores, incluyendo el MPM. Sin embargo, la obtención de muestras de tejido, pleural en el caso

del MPM, requiere de procedimientos invasivos. Una forma adicional de aprovechar la potencialidad de los miRNAs es identificar aquéllos localizados en muestras biológicas que puedan ser obtenidas con procedimientos menos invasivos, como la sangre periférica, lo cual inició en el año 2012 (Tabla 5).

- i. Kirschner y colaboradores, en el 2012 (124) buscaron biomarcadores de diagnóstico potenciales miRNAs en el plasma de pacientes con MPM comparados con sujetos control (sujetos sanos y sujetos con enfermedades arterocoronarias), además de miRNAs en muestras histológicas de MPM comparado con tejido pericárdico conservado en FFPE. Mediante la técnica de microarreglos (V3, miRBase V12.0, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) se analizaron 854 miRNAs en el plasma de 5 pacientes con MPM y 3 sujetos control. Los resultados indicaron 15 miRNAs sobre-expresados en MPM (hsa-miR-186-3p, hsa-miR-520a-3p, hsa-miR-625-3p, hsa-miR-26a-2-3p, hsa-miR-196b, hsa-miR-454-5p, hsa-miR-1914-3p, hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-767-3p, hsa-miR-767-3p, hsa-miR-575, hsa-miR-29c, hsa-miR-92a, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-22 y hsa-miR-335-3p). 90 miRNAs se eligieron de la literatura como miRNAs asociados al MPM, sólo tres coincidieron con los resultados de este estudio (hsa-miR-29c, hsa-miR-92a y hsa-miR-196b). Se validaron los resultados de los 12 miRNAs con mayor sobre-expresión mediante RT-qPCR (Applied Biosystems) en el plasma de 15 pacientes con MPM y 14 sujetos control. Únicamente el hsa-miR-625-3p estaba sobre-expresado significativamente en MPM ($p = 0.004$). El análisis por ROC y AUC de dichos resultados mostraron que el miR-625-3p en plasma distinguía al MPM con una precisión de 82.4%, una sensibilidad del 73.33% y una especificidad del 78.57%. Se cuantificaron nuevamente al hsa-miR-625-3p en una nueva cohorte en suero de 30 pacientes con MPM y 10 pacientes con asbestosis. Se encontró que el hsa-miR-625-3p estaba sobre-expresado ($p = 0.023$) en el MPM, con una precisión del 79.3%, una sensibilidad del 70% y una especificidad el 90%. Finalmente se analizaron los 12 miRNAs sobre-expresados en 18 muestras de tejido de MPM y 7 muestras de tejido pericárdico (control) conservadas en FFPE mediante RT-qPCR. Se encontró la sobre-expresión de hsa-miR-625-3p en las muestras de tejido de MPM respecto al control ($p=0.012$), coincidiendo con los datos obtenidos de plasma. En contraste de lo obtenido en microarreglo, hsa-miR-29c se encontró sub-expresado en 15 de las 18 muestras de tejido de MPM ($p=0.005$), sin embargo, existen estudios que sugieren que la expresión de

miRNAs en tejido no necesariamente reflejan el tipo de miRNAs secretados (85, 89).

- ii. Tomasetti y colaboradores, en el 2012 (125) cuantificaron únicamente el hsa-miR-126 en el suero de 45 pacientes con MPM (sin tratamiento previo), 20 pacientes con diagnóstico de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) y 56 individuos sanos mediante RT-qPCR. Los resultados revelaron la sub-expresión significativa del hsa-miR-126 en pacientes con MPM comparado con los controles sanos y en MPM comparado con NSCLC, mientras que no se detectó una expresión diferencial en los pacientes con NSCLC comparado con los controles sanos. Además, encontraron una asociación entre los niveles bajos de miR-126 en circulación y un mal pronóstico en pacientes con MPM. El autor coincidió con la sub-expresión del hsa-miR-126 reportado en tejido pleural por Santarelli y colaboradores (113) y Cappelleso y colaboradores(122).
- iii. Weber y colaboradores en el 2012 (126) Analizaron los miRNAs expresados en la fracción celular de sangre periférica de pacientes con MPM, comparados con individuos expuestos a asbestos (AEC) sin diagnóstico de MPM e individuos sanos obtenidos de la población en general. Lo anterior indica que los miRNAs analizados no eran miRNAs secretados a circulación sino que provenían de las células de sangre periférica. Mediante la técnica de microarreglos (mirVana miRNA Probe Set v2.20, Ambion, Austin TX, USA) se analizaron 328 miRNAs en las muestras de 23 pacientes con MPM y 17 sujetos AEC. Los resultados indicaron la sobre-expresión de hsa-miR-20a ($p=0.0101$) y hsa-miR-103 ($p=0.0303$). Este análisis permitió identificar al hsa-miR-125a como el miRNA más estable, por lo que fue usado como normalizador para el análisis por RT-qPCR, en el cual se analizaron las 23 muestras de MPM, 17 muestras de AEC y 25 controles sanos. Los resultados indicaron que el hsa-miR-103 podía diferenciar significativamente al MPM vs AEC (sensibilidad=83% y especificidad=71%) y al MPM vs controles sanos (sensibilidad=78% y especificidad=76%). Se separaron subgrupos de pacientes y controles basados en el género, edad y estado de fumador o no y reportan que no encontraron diferencias significativas en la expresión del hsa-miR-103 asociadas a tales características, usando el análisis de Mann-Whitney.
- iv. Weber y colaboradores en el 2014 (127) continuaron con el primer análisis del hsa-miR-103 en el artículo del 2012, pero ahora combinado con la determinación de mesotelina en plasma (prueba de ELISA) y del hsa-miR-103a-3p en células

sanguíneas de pacientes con MPM e individuos expuestos al asbesto (RT-qPCR), como biomarcadores potenciales del MPM. Los resultados indicaron que tanto la mesotelina como el hsa-miR-103a-3p presentan una sub-expresión significativa en el MPM, excluyendo las muestras del subtipo histológico sarcomatoide en el grupo de MPM. La mesotelina presentó una sensibilidad del 74% y especificidad del 85%, mientras que el hsa-miR-103a-3p una sensibilidad del 89% y especificidad del 63%. Sin embargo, si se combinaba la determinación de mesotelina y el miRNA la sensibilidad era del 95% y la especificidad del 81%, mostrando una mejoría en la capacidad diagnóstica para el MPM (exceptuando el subtipo histológico sarcomatoide).

- v. Por otro lado, Gayosso-Gómez y colaboradores (2014) (128) realizaron un análisis de los miRNAs secretados en el suero de pacientes con diagnóstico de MPM, Adp y controles sanos, siendo el objetivo descubrir miRNAs con capacidad de diagnóstico para estas dos neoplasias. Se analizaron los miRNAs de una mezcla representativa de suero de de 22 pacientes con MPM, 36 pacientes con Adp y 45 individuos sanos como control, mediante secuenciación masiva (Illumina). Notablemente, este es uno de los pocos trabajos publicados que describen la verificación del estado de “sanos” en los individuos controles incluidos en el estudio (mediante espirometría, biometría hemática y química sanguínea, entre otros). Los resultados indicaron 7 miRNAs sobre-expresados en el suero de los pacientes con MPM y 12 miRNAs sobre-expresados en las muestras de suero en pacientes con Adp comparados con las muestras de suero control. De estos miRNAs, cuatro fueron comunes a ambas neoplasias (hsa-miR-4791, hsa-miR-185-5p, hsa-miR-96-5p y hsa-miR-1271-5p), mientras que el hsa-miR-1292, hsa-miR-409-5 y hsa-miR-92b-5p fueron sobre-expresados exclusivamente en el MPM. Debido a que frecuentemente se confunde el diagnóstico del MPM y el Adp, se analizaron los miRNAs diferencialmente expresados entre las dos neoplasias directamente. Los datos indicaron 13 miRNAs sobre-expresados en el MPM vs. Adp (hsa-miR-1292-5p, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-184, hsa-miR-1908, hsa-miR-23b-5p, hsa-miR-3198, hsa-miR-323b-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-409-5p, hsa-miR-4683, hsa-miR-4707-3p, hsa-miR-505-5p y hsa-miR-5706) y cinco miRNAs sub-expresados (hsa-miR-106-5p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-216b, hsa-miR-23c y hsa-miR-29b-3p). La desventaja de este estudio consistió en que no realizaron la

validación cuantitativa de los datos obtenidos (RT-qPCR) y una verificación en muestras individuales en lugar de mezclas representativas.

- vi. Lamberti y colaboradores (2015) (24) reportaron la identificación de dos patrones de expresión de miRNAs séricos que correlacionan con la prognosis del MPM y el subtipo histológico. Para ello, se analizaron los miRNAs en el suero de 14 pacientes con diagnóstico de MPM (3 de tipo sarcomatoide, 7 epiteloide y 4 mixtos) sin tratamiento previo *versus* 10 pacientes con derrame pleural de origen no-neoplásico como control. La técnica usada fue PCRArray (TaqMan microfluid cards, Applied Biosystems). Un detalle importante en este estudio es que no se informa del diagnóstico de los pacientes que se consideraron controles, lo cual podría ser relevante ya que los resultados de este análisis representan los miRNAs desregulados en MPM en relación a un control no-neoplásico pero desconocido. ¿Serán homogéneas las enfermedades de los controles? ¿de qué tipo de enfermedades hablamos, tal vez infecciosa bacteriana o viral?. Al margen de lo anterior, se reportaron la sobre-expresión del hsa-miR-101, hsa-miR-25, hsa-miR-26b, hsa-miR-335 y hsa-miR-433; y la sub-expresión del hsa-miR-191 y hsa-miR-223 en el MPM. Adicionalmente se reportó que el hsa-miR-29a y hsa-miR-516 se detectaron exclusivamente en pacientes con MPM. A continuación, en este estudio se menciona que se realizó RT-qPCR de los miRNAs identificados en un grupo “extendido” de muestras, sin embargo, señalan que los resultados se describen en una figura (Figura 1) que muestra los datos de sólo 14 pacientes de MPM (que es el mismo número de muestras usadas al inicio), sin más detalles aclaratorios. Los pacientes se subdividieron en 2 grupos: El grupo A, integrado por los pacientes con la sobre-expresión de $\geq 3/9$ miRNAs y hsa-miR-516 no detectable o sin cambios; y el grupo B integrado por los pacientes con al menos 3/9 miRNAs sub-expresados o son cambio y/o hsa-miR-29a sub-expresado. En base a estos criterios, los resultados indicaron que los pacientes del grupo A (n=5) tuvieron una supervivencia media significativamente más corta que los pacientes del grupo B (n=9) (7 meses vs. 17 meses, p=0.0021).

Hasta la fecha, no se han reportado publicaciones donde analicen el potencial de diagnóstico de los miRNAs en otros fluidos biológicos, para el caso del MPM.

Muestras como el líquido de derrame pleural podría ser una buena opción, debido primero a la frecuencia con la que se presenta en pacientes que acuden a buscar atención

médica y segundo a las evidencias que indican que los miRNAs en ese fluido tienen un valor diagnóstico en Adp por ejemplo (129).

La tabla 5 muestra el resumen de los trabajos publicados a la fecha, mientras que la **tabla 6** indica la lista de los miRNAs reportados como alterados en MPM en cada estudio para resaltar aquéllos que han sido reportados por más de un estudio. Lo anterior permite visualizar que la mayoría de los resultados son heterogéneos, si bien algunos miRNAs son comunes, como la sub-expresión de hsa-miR-126. La heterogeneidad en los resultados podría atribuirse a las diferentes estrategias usadas para la etapa de descubrimiento de los miRNAs, donde se utilizaron pruebas de tamizaje distintas, aunada a uso de líneas celulares cultivadas en lugar de tejido o células extraídas del tejido para dichas pruebas. Lo anterior no indica que los datos reportados en cada estudio son erróneos, sino que presentan variaciones dadas por las limitaciones y diferencias propias del tipo de prueba o muestra inicial usada. Por tanto, los miRNAs descubiertos en cada estudio adquirirán su valor diagnóstico al ser validados mediante una prueba cuantitativa como el RT-qPCR y en un número representativo de muestras de una población dada. Es recomendable entonces, la validación independiente y cuantitativa de los datos reportados, buscando una homogeneización de las técnicas y muestras biológicas usadas para tal fin.

La revisión sistemática de los miRNAs identificados en cada estudio (tabla 6) y las condiciones y estrategias experimentales usadas (tabla 5) es de suma utilidad para poder realizar un análisis del valor diagnóstico potencial de dichos miRNAs y proponer una contribución para la validación independiente de los datos reportados.

Tabla 5. MiRNAs como biomarcadores de del MPM.

Tipo de muestra	Número de muestras.	No. de miRNAs analizados	Ensayo	miRNAs con expresión alterada	Referencia
LINEAS CELULARES					
Lineas celulares y tejido pleural	2 lineas de MPM vs 1 de celulas mesoteliales inmortalizada. Después 24 muestras de tejido MPM de diferentes tipos histológicos	587	Microarreglos, RT-qPCR	RT-qPCR: hsa-miR-17-5p↑, hsa-miR-30c↑, hsa-miR-143↑, hsa-miR-106a ↑, hsa-miR-30e-5p↑, hsa-miR-21↑, hsa-miR-29a↓, hsa-miR-31↓, hsa-miR-222↓, hsa-miR-221↓	Bussaca, et al, 2010
Lineas celulares de MPM y control sano.	5 líneas celulares de pacientes con MPM vs 5 líneas celulares de cultivos primarios mesotelio pleural normal.	470	Microarreglos, RT-qPCR	Microarreglos: hsa-miR-182↑, hsa-miR-17-5p↑, hsa-miR-7↑, hsa-miR-92a-1↑, hsa-miR-92a-2↑, hsa-miR-33 hsa-miR-196b↑, hsa-miR-20a↑, hsa-miR-106a↑, hsa-miR-20b↑, hsa-miR-18a↑, hsa-miR-339↑, hsa-miR-106b↑, hsa-miR-19b↑, hsa-miR-25↑, hsa-miR-500↓, hsa-miR-549↓, hsa-miR-22↓, hsa-miR-214, hsa-miR-328↓, hsa-miR-146b↓, hsa-miR-497↓. RT-qPCR: hsa-miR-17-5p ↑, hsa-miR-20a↑, hsa-miR-92↑, hsa-miR-497↓	Balatti, et al, 2011
TEJIDO					
Tejido conservado en FFPE	7 muestras de tejido de MPM vs 97 de tejido de diversos carcinomas de origen epiteloide. Despues 32 muestras de MPM vs 113 de tejido de diversos carcinomas de origen epitelial. posteriormente 16 muestras de MPM y 23 de diversos carcinomas de origen epitelial. Finalmente 14 muestras de MPM y 46 muestras de carcinoma de origen epitelial	747	Microarreglos, RT-qPCR	Microarreglos: hsa-miR-200a↓, hsa-miR200b↓, hsa-miR-200c↓, hsa-miR-141↓, hsa-miR-429↓, hsa-miR192↓ hsa-miR-194↓, hsa-miR-193a-3p↑, hsa-miR-193a-5p↑, hsa-miR-193b↑ y hsa-miR-152↑ RT-qPCR: hsa-miR-193a-3p↑, hsa-miR-200c↓ y hsa-miR-192↓	Benjamin, et al, 2010.
Tejido pleural y tejido pulmonar fresco	15 muestras de tejido de MPM vs 10 muestras de tejido de Adp. Después 100 MPM vs 32 de ADP.	2,564	Microarreglos, RT-qPCR	MICROARREGLOS: hsa-miR-200a↓, hsa-miR-200c↓, hsa-miR-200b↓, hsa-miR-203↓, hsa-miR-141↓, hsa-miR-429↓ y hsa-miR-205↓. RT-QPCR: hsa-miR-200c↓, hsa-miR-200b↓, hsa-miR-203↓, hsa-miR-141↓, hsa-miR-429↓ y hsa-miR-205↓	Gee, et al, 2010
Tejido pleural fresco y lineas celulares	10 muestras de tejido pleural fresco con TTP ≥ 12 meses vs 24 muestras de tejido pleural fresco con TTP < 12. Despues 33 muestras de tejido pleural fresco con TTP ≥ 12 meses vs 50 muestras de tejido pleural fresco con TTP < 12. Posteriormente 16 muestras de MPM experimento ciego.	900	Microarreglos, RT-qPCR	microarreglos y RT-qPCR: miR- 29c ↓	Pass, et al, 2010.
Tejido pleural fresco, tejido pleural en FFPE y suero	10 muestras de tejido fresco de MPM vs 5 muestras de tejido sano. Despues 27 de tejido de MPM en FFPE vs 27 muestras de tejido no-canceroso adyacente. Finalmente 44 muestras de suero de MPM vs. 50 muestras sanas y 196 muestras de exposición a asbestos.	88	RT-qPCR	hsa-miR-335↓, hsa-miR-130a↓, hsa-miR193b↓, hsa-miR-30c↓, hsa-miR-212↓, hsa-miR-126↓*, hsa-miR-32↓ y hsa-miR-181c↓	Santarelli, et al, 2011.
Tejido FFPE	13 muestras de tejido en FFPE de MPM vs 13 muestras de tejido adyacente no-tumoral en FFPE	4	RT-qPCR	hsa-miR-221↑ y hsa-miR-17-5p↓	Andersen, et al, 2012
Tejido pleural fresco, congelado y en FFPE; tejido de peritoneo congelado Y FFPE. Lineas celulares de celulas mesoteliales	29 muestras de tejido de MPM vs 12 muestras de tejido de quistes mesoteliales peritoneales en FFPE. Posteriormente 6 muestras de MPM fresco vs. 14 muestras de tejido pleural sano. Despues 36 muestras de MPM congelado vs 36 quistes mesoteliales peritoneales congelados. Finalmente 4 lineas celulares de celulas mesoteliales vs 1 linea celular de mesotelio normal.	887	Microarreglos, RT-qPCR	Microarreglos: hsa-miR-424↑, hsa-miR-206↑, hsa-miR-1228↑, hsa-miR-595↑, hsa-miR-1306↑, hsa-miR-432↑, hsa-miR-181d↑, hsa-miR-548c-3p↑, hsa-miR-193a-5p↑, hsa-miR-1280↓, hsa-miR-181b↓, hsa-miR-210↓, hsa-miR-96↓, hsa-miR-204↓, hsa-miR-141↓, hsa-miR-200c↓, hsa-miR-145↓, hsa-miR-486-5p↓ y hsa-miR-1287↓. RT-qPCR: hsa-miR-145 ↓	Cioce, et al, 2014.
tejido pleural FFPE	5 muestras de tejido con MPM vs. 5 muestras de tejido adyacente no canceroso y tejido no inflamatorio. 4 muestras de Paquipleuritis vs 5 tejido adyacente no canceroso y tejido no inflamatorio. 5 muestras de tejido de hiperplasia mesotelial vs 5 muestras de tejido adyacente no canceroso y tejido no inflamatorio.	667	PCRArray	RT-qPCR: hsa-miR-517b-3p↓, hsa-miR-627↓, hsa-miR-766-3p↓, hsa-miR-101-3p↓, hsa-miR-501-3p↓, hsa-miR-212-3p↓, hsa-miR-596↓, hsa-miR-145-5p↓, hsa-miR-671-3p↓, hsa-miR-181a-5p↓, hsa-miR-18a-3p↓, hsa-miR-30e-3p↑, hsa-miR-34a-3p↑, hsa-miR-622↑, let-7-g-5p↑, hsa-miR-196b-5p↑, hsa-miR-135b-5p↑, hsa-miR-18a-5p↑, hsa-miR-302b-3p↑.	Ramírez-Salazar, et al, 2014.

Continuación tabla 5. MiRNAs como biomarcadores de del MPM.

Tipo de muestra	Número de muestras.	No. de miRNAs analizados	Ensayo	miRNAs con expresión alterada	Referencia
TEJIDO					
tejido pleural FFPE	5 muestras de MPM (Qt) vs.5 muestras de MPM (sin Qt) y 5 muestras de tejido sano adyacente.	742	PCR Array, RT-qPCR	miR-126↓*, miR-143↓, miR-145↓, miR-652 ↓	Andersen, et al, 2014
Tejido pleural FFPE, citología pleural en alcohol y líneas celulares	51 muestras de tejido de MPM vs. 40 de células mesoteliales reactivas. Despues 24 muestras citologicas de células mesoteliales reactivas vs. 29 de MPM. Finalmente 1 Línea celular de células mesoteliales y 2 líneas de MPM	15	RT-qPCR	miR-19a↑, miR-19b↑, miR-25↑, miR-21↑, miR-126↓*	Cappellesso, et al, 2015.
Tejido pleural congelado	18 muestras de tejido de MPM vs 6 muestra de tejido pleural de pacientes con Derrame pleural benigno asociado a asbesto (BAPE).	384	Taq Man Array	hsamiR- 484↑, hsa-miR-320↑, hsa-let-7a↑, hsa-miR-744↑, hsa-miR-20a↑, hsa-miR-193b↑, hsa-let-7d ↑, hsa-miR-125a-5p↑, hsa-miR-92a↑, hsa-miR-152↑ y hsa-miR-155↑.	Ak, et al, 2014
SANGRE PERIFERICA					
Plasma, suero y tejido tumoral de MPM y pericardico en FFPE	44 muestras de plasma y suero de MPM vs 24 sanos y con enfermedades arteroconoronarias. Despues 18 muestras de tejido de MPM vs 7 de tejido pericardico.	854	Microarreglos, RT-qPCR	Microarreglos: hsa-miR-186-3p↑, hsa-miR-520a-3p↑, hsa-miR-625-3p↑, hsa-miR-26a-2-3p↑, hsa-miR-196b↑, hsa-miR-454-5p↑, hsa-miR-1914-3p↑, hsa-miR-548c-3p↑, hsa-miR-767-3p↑, hsa-miR-575↑, hsa-miR-29c↑, hsa-miR-92a↑, hsa-miR-483-5p↑, hsa-miR-22↑ y hsa-miR-335-3p↑ RT-qPCR: hsa-miR-625-3p ↑	Kirschner, et al, 2012.
fraccion celular de sangre periferica	23 muestras de la fraccion celular de MPM vs. 17 individuos expuestos a asbestos. Despues 23 muestras de la fraccion celular de MPM vs. 17 individuos expuestos a asbestos y 25 muestras de individuos sanos	328	Microarreglos, RT-qPCR	Microarreglos: hsa-miR-302↑, -214↑, -323↑, -525↑, -377↑, -302b↑, -329↑, -539↑, -520g↑, -10b↑, -371↑, -507↑, 302a↓, -23b↓, -30c↓, -30b↓, -182↓, -106b↓, -363↓, -144↓, 30d↓, -24↓, -142-5p↓, -148a↓, -29c↓, -15b↓, -29b↓, -195↓, -17-5p↓, -92↓, -7b↓, -101↓, -215↓, -25↓, -26b↓, -16↓, -20a↓, -20b↓, -103↓, -21↓, -107↓ hsa-let-7d↓, -let-7c↓, let-7i↓, -let-7a↓, -let-7f↓, let-7e↓. RT-qPCR: hsa-miR-103 ↓ y hsa-miR-20a↓	Weber, et al,2012
Suero	45 muestras de suero de MPM vs 20 de NSCLC	1	RT-qPCR	miR-126 ↓	Tomasetti, et al, 2012
suero y paquete celular	43 muestras de suero y paquete celular de MPM vs. 52 individuos sanos expuestos al Asbesto	1	RT-qPCR	miR-103a-3p ↑	Weber, et al, 2014.
Suero	11 muestras de suero de MPM epiteloide vs. 36 de Adp	300	Secuenciación Illumina	MPM vs. Adp: hsa-mir-1292-5p↑, hsa-140-5p↑, hsa-miR-184↑, hsa-miR-1908↑, hsa-miR-23b-5p↑, hsa-miR-3198↑, hsa-miR-323b-3p↑, hsa-miR-331-3p↑, hsa-mir-409-5p↑, hsa-miR-4683↑, hsa-miR-4707-3p↑, hsa-miR-505-5p↑, hsa-miR-5706↑, hsa-miR-106-5p↓, hsa-miR-200b-3p↓, hsa-miR-216b↓, hsa-miR-23c↓ y hsa-miR-29b-3p↓. Solo MPM: hsa-miR-1292-5p↑, has-miR-409-5p↑ y has-miR-92b-5p↑. MPM vs control: hsa-miR-1292-5p↑, hsa-miR-409-5p↑ y hsa-miR-92b-5p↑. MPM y Adp vs control: hsa-miR-4791↑, hsa-miR-185-5p↑, hsa-miR-96-5p↑, hsa-miR-1271-5p↑	Gayosso-Gómez, et al, 2014.
Suero criopreservado	14 muestras de MPM vs. 10 muestras de derrame pleural no neoplasico.	384	TaqMan Array y RT-qPCR.	TaqMan Array y RT-qPCR: hsa-miR-101↑, hsa-miR-25↑, hsa-miR-26b↑, hsa-miR-335↑, hsa-miR-29a↑, hsa-miR-516↑, hsa-miR-433↑, hsa-miR-191↓, hsa-miR-223↓.	Lamberti, et al, 2015

Tabla 6. miRNAs reportados como alterados en MPM en publicaciones con "peer review" (2010- junio 2016)

miRNAs	Bussaca, et al, 2010	Balatti, et al, 2011	Benjamin, et al, 2010	Gee, et al, 2011	Pass, et al, 2010	Santarelli, et al, 2011	Andersen, et al, 2012.	Cioce, et al, 2014	Ramirez-Salazar, et al, 2014.	Andersen, et al, 2014	Cappelleso, et al, 2015	Ak, et al, 2015	Tomasetti, et al, 2012	Krischnr, et al, 2012	Weber, et al, 2012	Weber, et al, 2014.	Gayoso-Gomez, et al, 2014	Lamberti, et al, 2015	No. De menciones en MPM
hsa-miR-143 [†] *	X										X								2
hsa-miR-17-5p [†] *							X												2
hsa-miR-17-5p [†] *	X	X													X				1
hsa-miR-143 [†] *										X									1
hsa-miR-21 [†]	X																		1
hsa-miR-30e-5p [†]	X																		1
hsa-miR-196b-5p [†]									X										1
hsa-miR-92 [†]															X				1
hsa-miR-92 [†]		X														X			1
hsa-miR-182 [†]																X			1
hsa-miR-182 [†]		X																	1
hsa-let-7-g-5p [†]									X										1
hsa-miR-7 [†]		X																	1
hsa-let-7a [†]															X				1
hsa-let-7a [†]												X							1
hsa-let-7d [†]																X			1
hsa-let-7d [†]												X							1
hsa-miR-33 [†]		X																	1
hsa-miR-29c [†]					X										X				1
hsa-miR-29c [†]		X												X					2
hsa-miR-92a-2 [†]		X																	1
hsa-miR-101 [†]																		X	1
hsa-miR-103 [†]															X				1
hsa-miR-103a-3p [†]																X			1
hsa-miR-106a [†]	X	X																	2
hsa-miR-125a-5p [†]												X							1
hsa-miR-1271-5p [†]																		X	1
hsa-miR-1292-5p [†]																		X	1
hsa-miR-140-5p [†]																		X	1
hsa-miR-135b-5p [†]									X										1
hsa-miR-152 [†]												X							1
hsa-miR-155 [†]												X							1
hsa-miR-186-3p [†]															X				1
hsa-miR-18a [†]		X																	1
hsa-miR-18a-5p [†]																			1
hsa-miR-1914-3p [†]										X									1
hsa-miR-181d [†]																			1
hsa-miR-184 [†]																			1
hsa-miR-185-5p [†]																		X	1
hsa-miR-193a-3p [†]			X															X	1
hsa-miR-193a-5p [†]																			1
hsa-miR-106b [†]																			1
hsa-miR-106b [†]		X													X				1
hsa-miR-193b [†]						X													1
hsa-miR-193b [†]												X							1
hsa-miR-196b [†]		X													X				2
hsa-miR-10b [†]																			1
hsa-miR-19a [†]													X						1
hsa-miR-19b [†]		X										X							2
hsa-miR-20a [†]																			1
hsa-miR-20a [†]		X										X							1
hsa-miR-20b [†]																			1
hsa-miR-20b [†]		X																	1
hsa-miR-23b-5p [†]																			1
hsa-miR-22 [†]															X				1
hsa-miR-25 [†]																			1
hsa-miR-25 [†]		X													X				3
hsa-miR-26a-2-3p [†]																		X	1
hsa-miR-26B [†]															X				1

X: miRNAs encontrados únicamente mediante microarreglos

X: miRNAs encontrados por los demás métodos mencionados anteriormente excepto microarreglos

Tabla 6 continuación. miRNAs reportados como alterados en MPM en publicaciones con "peer review" (2010- junio 2016)

miRNAs	Bussaca, et al, 2010	Balatti, et al, 2011	Benjamin, et al, 2010	Gee, et al, 2011	Pass, et al, 2010	Santarelli, et al, 2011	Andersen, et al, 2012.	Cioce, et al, 2014	Ramirez-Salazar, et al, 2014.	Andersen, et al, 2014	Cappelleso, et al, 2015	Ak, et al, 2015	Tomasetti, et al, 2012	Krischner, et al, 2012	Weber, et al, 2012	Weber, et al, 2014.	Gayoso-Gomez, et al, 2014	Lamberti, et al, 2015	No. De menciones en MPM
hsa-miR-26B↓															X				1
hsa-miR-26b↑																		X	1
hsa-miR-214↓															X				1
hsa-miR-29a↑																		X	1
hsa-miR-302↑															X				1
hsa-miR-302b↑															X				1
hsa-miR-302b-3p↑									X										1
hsa-miR-30c↓						X										X			2
hsa-miR-30c↑	X																		1
hsa-miR-30e-3p↑									X										1
hsa-miR-206↑								X											1
hsa-miR-320↑											X								1
hsa-miR-323↑															X				1
hsa-miR-323b-3p↑																	X		1
hsa-miR-329↑															X				1
hsa-miR-331-3p↑																	X		1
hsa-miR-335-3p↑														X					1
hsa-miR-335↑						X												X	2
hsa-miR-339↑		X																	1
hsa-miR-371↑															X				1
hsa-miR-377↑															X				1
hsa-miR-34a-3p↑									X										1
hsa-miR-409-5p↑																	X		1
hsa-miR-424↑								X											1
hsa-miR-432↑								X											1
hsa-miR-433↑																		X	1
hsa-miR-454-5p↑														X					1
hsa-miR-479↑																	X		1
hsa-miR-483-5p↑														X					1
hsa-miR-484↑												X							1
hsa-miR-505-5P↑																	X		1
hsa-miR-507↑															X				1
hsa-miR-516↑																		X	1
hsa-miR-520a-3p↑														X					1
hsa-miR-520g↑															X				1
hsa-miR-525↑															X				1
hsa-miR-539↑															X				1
hsa-miR-548c-3P↑								X						X					2
hsa-miR-548-3p↑														X					1
hsa-miR-575↑														X					1
hsa-miR-595↑								X											1
hsa-miR-622↑									X										1
hsa-miR-625-3p↑														X					1
hsa-miR-744↑												X							1
hsa-miR-1908↑																	X		1
hsa-miR-1228↑								X											1
hsa-miR-1306↑								X											1
hsa-miR-3198↑																	X		1
hsa-miR-4707-3p↑																	X		1
hsa-miR-4683↑																	X		1
hsa-miR-5706↑																	X		1
hsa-miR-767-3p↑														X					1
hsa-miR-92a↑												X		X					2
hsa-miR-92b-5p↑																	X		1
hsa-miR-96-5p↑																	X		1
hsa-miR-221↑*							X												1
hsa-miR-221↓*	X																		1
hsa-miR-222↓	X																		1
hsa-miR-7b↓															X				1
hsa-let-7C↓															X				1
hsa-let-7f↓															X				1
hsa-let-7e↓															X				1
hsa-let-7f↓															X				1

X: miRNAs encontrados únicamente mediante microarreglos

X: miRNAs encontrados por los demás métodos mencionados anteriormente excepto microarreglos

Tabla 6 continuación. miRNAs reportados como alterados en MPM en publicaciones con "peer review" (2010- junio 2016)

miRNAs	Bussaca, et al, 2010	Balatti, et al, 2011	Benjamin, et al, 2010	Gee, et al, 2011	Pass, et al, 2010	Santarelli, et al, 2011	Andersen, et al, 2012.	Cioce, et al, 2014	Ramirez-Salazar, et al, 2014.	Andersen, et al, 2014	Cappelleso, et al, 2015	Ak, et al, 2015	Tomasetti, et al, 2012	Krischner, et al, 2012	Weber, et al, 2012	Weber, et al, 2014.	Gayoso-Gomez, et al, 2014	Lamberti, et al, 2015	No. De menciones en MPM
hsa-miR-15b															X				1
hsa-miR-16															X				1
hsa-miR-18a-3p									X						X				1
hsa-miR-21															X				1
hsa-miR-22		X													X				1
hsa-miR-23b															X				1
hsa-miR-23c															X		X		1
hsa-miR-24															X				1
hsa-miR-29a	X														X				1
hsa-miR-29b															X				1
hsa-miR-29b-3p															X		X		1
hsa-miR-30b															X				1
hsa-miR-30d															X				1
hsa-miR-32						X									X				1
hsa-miR-96								X							X				1
hsa-miR-31	X														X				1
hsa-miR-101									X						X				1
hsa-miR-101-3p															X				1
hsa-miR-106-5p															X		X		1
hsa-miR-126						X				X	X		X		X				4
hsa-miR-141				X				X							X				2
hsa-miR-130a						X									X				1
hsa-miR-146b		X													X				1
hsa-miR-142-5p															X				1
hsa-miR-144															X				1
hsa-miR-145								X		X					X				2
hsa-miR-145-5p									X						X				1
hsa-miR-148a															X				1
hsa-miR-181a-5p									X						X				1
hsa-miR-181c						X									X				1
hsa-miR-181b								X							X				1
hsa-miR-191															X			X	1
hsa-miR-192			X												X				1
hsa-miR-195			X	X											X				2
hsa-miR-200a			X	X											X				2
hsa-miR-200b			X	X				X							X				2
hsa-miR-200c			X	X				X							X				1
hsa-miR-203				X											X				1
hsa-miR-204								X							X				1
hsa-miR-205				X											X				1
hsa-miR-210								X							X				1
hsa-miR-212						X									X				1
hsa-miR-212-3p									X						X				1
hsa-miR-215															X				1
hsa-miR-216b															X		X		1
hsa-miR-328		X													X				1
hsa-miR-302a															X				1
hsa-miR-363															X				1
hsa-miR-223															X			X	1
hsa-miR-429			X	X											X				2
hsa-miR-486-5p								X							X				1
hsa-miR-497		X													X				1
hsa-miR-500		X													X				1
hsa-miR-501-3p									X						X				1
hsa-miR-517b-3p									X*						X				1
hsa-miR-596									X						X				1
hsa-miR-627									X						X				1
hsa-miR-766-3p									X						X				1
hsa-miR-1280								X							X				1
hsa-miR-1287								X							X				1
hsa-miR-549		X													X				1
hsa-miR-671-3p									X						X				1
hsa-miR-652										X					X				1

X: miRNAs encontrados únicamente mediante microarreglos

X: miRNAs encontrados por los demás métodos mencionados anteriormente excepto microarreglos

CONCLUSIONES

El diagnóstico certero del MPM suele ser difícil y complejo, debido en parte a que la prueba diagnóstica “estándar de oro” es subjetiva y cualitativa. La dificultad en el diagnóstico ha llevado a la búsqueda de nuevas herramientas diagnósticas que pudieran sumarse a los recursos usados actualmente en la clínica.

A ese respecto, los miRNAs han sido señalados como biomarcadores de diagnóstico potenciales de múltiples neoplasias. Estos miRNAs pueden determinarse cuantitativamente y se encuentran de forma estable en muestras biológicas como tejido y fluidos.

En el caso particular del MPM, los estudios enfocados en el potencial de diagnóstico de los miRNAs iniciaron recientemente (2010). Estos estudios fueron descritos en esta revisión y se analizaron las aportaciones y limitaciones de las estrategias usadas y resultados reportados. Concluimos que:

- I. Los datos reportados son prometedores, pero es importante señalar que la mayoría de dichos resultados son heterogéneos. Lo anterior podría atribuirse a la heterogeneidad en las estrategias y técnicas de tamizaje y cuantificación usadas en cada estudio, aunada al uso de muestras biológicas diversas o conservadas de forma distinta.
- II. A pesar de la heterogeneidad de los datos reportados, las evidencias indican que los miRNAs podrían ser usados como una herramienta de diagnóstico del MPM que se suma a las herramientas actuales usadas en la clínica.
- III. A la fecha, ninguno de los estudios ha alcanzado el objetivo final que es el uso de los miRNAs como biomarcadores de diagnóstico en la clínica.
- IV. Para alcanzar el objetivo final anterior, es necesario la validación independiente de los datos reportados y la homogenización de las técnicas y tipo de muestras usadas para tal fin.
- V. La revisión sistemática de los miRNAs identificados en cada estudio (tabla 6) y las condiciones y estrategias experimentales usadas (tabla 5) es de suma utilidad para poder realizar un análisis del valor diagnóstico potencial de dichos miRNAs y proponer una contribución para la validación independiente de los datos reportados.

LITERATURA CITADA

1. De Paoli L, Quaia E, Poillucci G, Gennari A, Cova MA. Imaging characteristics of pleural tumours. *Insights Imaging*. 2015;6(6):729-40.
2. Davidson B. Prognostic factors in malignant pleural mesothelioma. *Hum Pathol*. 2015;46(6):789-804. Epub 2015/04/01.
3. Roe OD, Stella GM. Malignant pleural mesothelioma: history, controversy and future of a manmade epidemic. *Eur Respir Rev*. 2015;24(135):115-31. Epub 2015/03/03.
4. Robinson BWS, Lake RA. Advances in Malignant Mesothelioma. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(15):1591-603.
5. Kaufman AJ PH. Current concepts in malignant pleural mesothelioma. . *Expert Rev Anticancer Ther*. 2008;8:293–303.
6. Bianchi C BT. Malignant mesotelioma:global incidence and relationship with asbestos. *Industrial Health*. 2007;45(3):379-87.
7. Wang NS. Anatomy and physiology of the pleura sapace clin *Chest Med*. 1985;6:3-16.
8. Finley DJ, Rusch VW. Anatomy of the pleura. *Thorac Surg Clin*. 2011;21(2):157-63, vii. Epub 2011/04/12.
9. Charalampidis C, Youroukou A, Lazaridis G, Baka S, Mpoukovinas I, Karavasilis V, et al. Pleura space anatomy. *J Thorac Dis*. 2015;7(Suppl 1):S27-32. Epub 2015/03/17.
10. Antony VB. Immunological mechanisms in pleural disease. *European Respiratory Journal*. 2003;21(3):539-44.
11. Finley DJ, Rusch, V.W. Anatomy of the pleura. *Thorac Surg Clin*. 2011;21(1):157-63.
12. Poizat MÉH-FJCMCABFCSDPKRL-AGLML-BA. Peritoneal malignant mesothelioma: review and recent data. *Annales De Pathologie* 2014;34(1):26-33.
13. Roggli VL SA, Butnor KJ, Sporn T, Vollmer RT. Malignant mesothelioma and occupational exposure to asbestos: a clinicopathological correlation of 1445 cases. . *Ultrastruct Pathol* 2002;26(2):55-65.
14. Ray M, Kindler HL. Malignant pleural mesothelioma: an update on biomarkers and treatment. *Chest*. 2009;136(3):888-96. Epub 2009/09/09.
15. Delgermaa V TK, Park EK, Le GV, Hara T, Sorahan T. Global mesothelioma deaths reported to the World Health Organization between 1994 and 2008. *Bull World Health Organ*. 2011;89(10):716-24.
16. Park E-K, Takahashi, K., Hoshuyama, T., Cheng, T.-J., Delgermaa, V., Le, G. V., & Sorahan, T. (2011). Global Magnitude of Reported and Unreported Mesothelioma. *Environmental Health Perspectives*, 119(4), 514–518. <http://doi.org/10.1289/ehp.1002845>. Global Magnitude of Reported and Unreported Mesothelioma. . *Environmental Health Perspectives*. 2011;119(4):514-8.
17. Addis B, Roche H. Problems in mesothelioma diagnosis. *Histopathology*. 2009;54(1):55-68.
18. Inai K. Pathology of mesothelioma. *Environ Health Prev Med*. 2008;13(2):60-4.
19. Karpathiou G, Stefanou D, Froudarakis ME. Pleural neoplastic pathology. *Respir Med*. 2015;109(8):931-43.
20. Ascoli V. Pathologic diagnosis of malignant mesothelioma: chronological prospect and advent of recommendations and guidelines. *Ann Ist Super Sanita*. 2015;51(1):52-9.
21. Travis D.W. EB, H.K. Müller-Hermelink Y C.C. Harris. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. . *World Health Organization Classification of Tumours*. 2004;.7:1-344.
22. Doll R. Asbestos effects on health of exposure to asbestos: Health and Safety Commission; 1996.
23. Aguilar-Madrid G. R-PE, Juárez-Pérez C.A., Alvarado-Cabrero I., Rico-Méndez F.G., Javier K.G. Case-control study of pleural mesothelioma in workers with social security in Mexico. *Am J Ind Med* 2010;53(3):241-51.

24. Lamberti M, Capasso R, Lombardi A, Di Domenico M, Fiorelli A, Feola A, et al. Two Different Serum MiRNA Signatures Correlate with the Clinical Outcome and Histological Subtype in Pleural Malignant Mesothelioma Patients. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135331.
25. Huw D. Roach GJD, Richard Attanoos, Michael Crane, Haydn Adams, Sian Phillips, . Asbestos: When the Dust Settles—An Imaging Review of Asbestos-related Disease. *Radiographics*. 2002;22:167-84.
26. Nishimura Y, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Lee S, Maeda M, Kishimoto T, et al. Functional Alteration of Natural Killer Cells and Cytotoxic T Lymphocytes upon Asbestos Exposure and in Malignant Mesothelioma Patients. *Biomed Res Int*. 2015;2015:238431.
27. Batra H, Antony VB. Pleural mesothelial cells in pleural and lung diseases. *J Thorac Dis*. 2015;7(6):964-80.
28. Carbone M BC. The pathogenesis of mesothelioma. *Semin Diagn Pathol*. 2006;23(1):56-60.
29. Bianchi ME, Manfredi AA. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2007;220:35-46. Epub 2007/11/06.
30. Xu A, Zhou H, Yu DZ, Hei TK. Mechanisms of the genotoxicity of crocidolite asbestos in mammalian cells: implication from mutation patterns induced by reactive oxygen species. *Environmental health perspectives*. 2002;110(10):1003-8. Epub 2002/10/04.
31. Yang H, Bocchetta M, Kroczyńska B, Elmishad AG, Chen Y, Liu Z, et al. TNF-alpha inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF-kappaB-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(27):10397-402. Epub 2006/06/27.
32. Yang H, Rivera Z, Jube S, Nasu M, Bertino P, Goparaju C, et al. Programmed necrosis induced by asbestos in human mesothelial cells causes high-mobility group box 1 protein release and resultant inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(28):12611-6. Epub 2010/07/10.
33. Wen H, Miao EA, Ting JP. Mechanisms of NOD-like receptor-associated inflammasome activation. *Immunity*. 2013;39(3):432-41. Epub 2013/09/24.
34. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*. 2008;320(5876):674-7. Epub 2008/04/12.
35. Carbone M, Emri S, Dogan AU, Steele I, Tuncer M, Pass HI, et al. A mesothelioma epidemic in Cappadocia: scientific developments and unexpected social outcomes. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(2):147-54. Epub 2007/01/26.
36. Ohar JA, Cheung M, Talarchek J, Howard SE, Howard TD, Hesdorffer M, et al. Germline BAP1 Mutational Landscape of Asbestos-Exposed Malignant Mesothelioma Patients with Family History of Cancer. *Cancer research*. 2016;76(2):206-15. Epub 2016/01/01.
37. Testa JR, Cheung M, Pei J, Below JE, Tan Y, Sementino E, et al. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet*. 2011;43(10):1022-5. Epub 2011/08/30.
38. Fang Y, Fu D, Shen XZ. The potential role of ubiquitin c-terminal hydrolases in oncogenesis. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1806(1):1-6. Epub 2010/03/23.
39. Teta MJ LE, Scurman BK, Wagner ME. Therapeutic radiation for lymphoma: risk of malignant mesothelioma. *109*. 2007;7(cancer):1432-8.
40. Hmeljak J, Cör A. Presence and role of Simian Virus 40 (SV40) in malignant pleural mesothelioma. *Radiology and Oncology*. 2009;43(1).
41. Yang H, Testa JR, Carbone M. Mesothelioma epidemiology, carcinogenesis, and pathogenesis. *Curr Treat Options Oncol*. 2008;9(2-3):147-57.
42. Thanh TD, Tho NV, Lam NS, Dung NH, Tabata C, Nakano Y. Simian virus 40 may be associated with developing malignant pleural mesothelioma. *Oncol Lett*. 2016;11(3):2051-6.
43. Echegoyen R.C. RMRR. . Asbestosis y mesotelioma pleural maligno. . *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM* 2013;56(2): 5-17.

44. P.F R. Diagnóstico y tratamiento del mesotelioma pleural maligno. Arch Bronconeumol. 2015;51(4):177–84.
45. R.G.L. T. Derrame Pleural. Medicina y Laboratorio. 2009;15(11-26).
46. Heffner J.E. KJS. Recent Advances in the Diagnosis and Management of Malignant Pleural Effusions. Mayo Clinic Proceedings. 2008;83(2):235 - 50.
47. McGrath EE, Anderson PB. Diagnosis of pleural effusion: a systematic approach. Am J Crit Care. 2011;20(2):119-27; quiz 28.
48. Kushwaha R, Shashikala P, Hiremath S, Basavaraj HG. Cells in pleural fluid and their value in differential diagnosis. Journal of Cytology. 2008;25(4):138.
49. Aliya N. Husain TVC, Nelson G. Ordóñez, Thomas Krausz, Alain Borczuk, Philip T. Cagle, Lucian R. Chirieac, Andrew Churg, Francoise Galateau-Salle, Allen R. Gibbs, Allen M. Gown, Samuel P. Hammar, Leslie A. Litzky, Victor L. Roggli, William D. Travis, Mark R. Wick Guidelines for Pathologic Diagnosis of Malignant Mesothelioma: A Consensus Statement from the International Mesothelioma Interest Group. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 2009;133(8):1317-31.
50. Arif Q, Husain AN. Malignant Mesothelioma Diagnosis. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 2015;139(8):978-80.
51. Husain AN, Colby TV, Ordonez NG, Krausz T, Borczuk A, Cagle PT, et al. Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma: a consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group. Archives of pathology & laboratory medicine. 2009;133(8):1317-31. Epub 2009/08/06.
52. Galateau-Salle F, Churg A, Roggli V, Travis WD, World Health Organization Committee for Tumors of the P. The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Pleura: Advances since the 2004 Classification. J Thorac Oncol. 2016;11(2):142-54.
53. Jelena Kresoja-Rakic EK, Gabriela Ziltener, Damian Dalcher, Raffaella Santoro, Brock C. Christensen, Kevin C. Johnson, Beat Schwaller, Walter Weder, Rolf A. Stahel, Emanuela Felley-Bosco. identification of cis- and trans- acting elements regulating carletinin expression in mesotelioma cells. Oncotarget. 2016;7(16):21272-86.
54. Cid Mouteira P O-RJ, Gómez de María C, San Miguel Fraile P, Albor Barroso A, Regueiro Parceros B, Antón Badiola I. Expresión de Citoqueratina 5 y Calretinina en el carcinoma renal de células claras. Actas Urológicas Españolas. 2006;30(4):367-71.
55. Roland Mall WWF, Dorothea L. Schiller. The Catalog of Human Cytokeratins: Patterns of Expression in Normal Epithelia, Tumors and Cultured Cells. Cell. 1982;31:11-24,.
56. Félix Ignacio Téllez-Ávila SMG-O. El antígeno carcinoembrionario: a propósito de un viejo conocido. Revista de Investigación Clínica. 2005;5(6):814-8.
57. Sheibani K1 SS, Kezirian J, Weiss LM. Ber-EP4 antibody as a discriminant in the differential diagnosis of malignant mesothelioma versus adenocarcinoma. Am J Surg Pathol. 1991;15(8):779-84.
58. Holloway AJ, Diyagama DS, Opeskin K, Creaney J, Robinson BW, Lake RA, et al. A molecular diagnostic test for distinguishing lung adenocarcinoma from malignant mesothelioma using cells collected from pleural effusions. Clin Cancer Res. 2006;12(17):5129-35.
59. Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. Cancer research. 2006;66(15):7390-4. Epub 2006/08/04.
60. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell. 2009;136(4):642-55.
61. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. Cell. 2004;116:281-97.
62. Ahmad J HS, Siddiqui MA, Ahamed M, Musarrat J, Al-Khedhairi A.A. MicroRNA in carcinogenesis & cancer diagnostics: a new paradigm. Indian J Med Res 2013;137(4):680-94.
63. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. Cell. 2006;125(5):887-901. Epub 2006/06/06.

64. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004;10(2):185-91. Epub 2004/01/20.
65. Edyta Koscianska. JS-R, Wlodzimierz J. Krzyzosiak. The Role of Dicer Protein Partners in the Processing of MicroRNA Precursors. *plus one*. 2011;6(12):28-48.
66. Blanca. O-Q. RNA de interferencia: Origen y aplicacion en el silenciamiento de genes. *. Revista de Investigacion Clinica* 2009;61(5):412-27.
67. Taylor M. Circulating MicroRNAs as Biomarkers and Mediators of Cell–Cell Communication in Cancer. *Biomedicines*. 2015;3(4):270-81.
68. Gayosso-Gómez L.V. LCS-S, G. Zárraga-Granados, E.G. Ramírez-Salazar, B. Ortiz-Quintero. MicroRNAs como herramienta potencial para el diagnóstico del mesotelioma pleural maligno. *Neumol Cir Torax*. 2013;72(2):789–804.
69. Ávila-Moreno F. FUyBO-Q. MicroRNAs en el diagnóstico y prognosis del cáncer pulmonar. *Revista de Investigación Clínica*. 2011;63(5):516.
70. Margaret S. Ebert PAS. Roles for MicroRNAs in Conferring Robustness to Biological Processes. *Cell*. 2012;149(3):515-24.
71. Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA*. 2007;297(17):1901-8.
72. Zhao N, Liu Y, Chang Z, Li K, Zhang R, Zhou Y, et al. Identification of Biomarker and Co-Regulatory Motifs in Lung Adenocarcinoma Based on Differential Interactions. *PLoS One*. 2015;10(9):e0139165.
73. B. O-Q. Cell-free microRNAs in blood and other body fluids as cancer biomarkers. *Cell Prolif*. 2016;49(3):281-303.
74. Anna M. Krichevsky GG. miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med* 2008;13(1):39-53.
75. Shuomin Zhu M-LS, Hailong Wu, Yin-Yuan Mo. MicroRNA-21 Targets the Tumor Suppressor Gene Tropomyosin 1 (TPM1). *The Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(19):14328-36.
76. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(8):509-24.
77. Falcone G, Felsani A, D'Agnano I. Signaling by exosomal microRNAs in cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34:32.
78. Heredia-Melo L. CAC-SyLAM. Los microRNA: nuevos actores en la obesidad.. *Evid Med Invest Salud* 2015;8(4):172-9.
79. Ortiz-Quintero B. Cell-free microRNAs in blood and other body fluids, as cancer biomarkers. *Cell Prolif*. 2016;49(3):281-303. Epub 2016/05/25.
80. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(30):10513-8. Epub 2008/07/30.
81. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research*. 2008;18(10):997-1006. Epub 2008/09/04.
82. Verena Köberle TP, Christian Schmithals, Eduardo Augusto Alonso, Jörg Haupenthal, Halvard Böning, Jan Peveling-Oberhag, Ricardo M. Biondi, Stefan Zeuzem, Bernd Kronenberger, Oliver Waidmann, Albrecht Piiper. Differential Stability of Cell-Free Circulating microRNAs: Implications for Their Utilization as Biomarkers. *PLoS One*. 2013;8(9):1-11.
83. Patrick S. Mitchell RKP, Evan M. Kroh, Brian R. Fritz, Stacia K. Wyman, Era L. Pogosova-Agadjanyan, Amelia Peterson, Jennifer Noteboom, Kathy C. O'Briant, April Allen, Daniel W. Lin, Nicole Urban, Charles W. Drescher, Beatrice S. Knudsen, Derek L. Stirewalt,, Robert Gentleman RLV, Peter S. Nelson, Daniel B. Martin Muneesh Tewari. Circulating

microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10513-8.

84. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic acids research*. 2011;39(16):7223-33. Epub 2011/05/26.

85. Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, Kim DJ, Hearn SA, Danforth D, et al. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One*. 2010;5(10):e13515.

86. Li L ZD, Huang L, Zhang J, Bian Z, Chen X, . Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles. . *PloS one* 2012;7(10):46-57.

87. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(12):5003-8. Epub 2011/03/09.

88. Zhang J. LS, Li L., Li M., Guo C., Yao J. y Mi S. . Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015;13(1):17-24.

89. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*. 2007;9(6):654-9. Epub 2007/05/09.

90. Lee Y, El Andaloussi S, Wood MJ. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Human molecular genetics*. 2012;21(R1):R125-34. Epub 2012/08/09.

91. Salido-Guadarrama I, Romero-Cordoba S, Peralta-Zaragoza O, Hidalgo-Miranda A, Rodriguez-Dorantes M. MicroRNAs transported by exosomes in body fluids as mediators of intercellular communication in cancer. *Onco Targets Ther*. 2014;7:1327-38.

92. Gibbins DJ CC, Erhardt M, Voinnet O. . Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. . *Nature cell biology* 2009;11(9):1143-9.

93. Lv Z, Wei Y, Wang D, Zhang CY, Zen K, Li L. Argonaute 2 in cell-secreted microvesicles guides the function of secreted miRNAs in recipient cells. *PloS one*. 2014;9(7):e103599. Epub 2014/07/30.

94. Yao B, La LB, Chen YC, Chang LJ, Chan EK. Defining a new role of GW182 in maintaining miRNA stability. *EMBO Rep*. 2012;13(12):1102-8.

95. Villarroya-Beltri C, Gutierrez-Vazquez C, Sanchez-Cabo F, Perez-Hernandez D, Vazquez J, Martin-Cofreces N, et al. Sumoylated hnRNP A2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature communications*. 2013;4:2980. Epub 2013/12/21.

96. Zubakov D, Boersma AW, Choi Y, van Kuijk PF, Wiemer EA, Kayser M. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med*. 2010;124(3):217-26.

97. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(20):7248-59.

98. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*. 2011;13(4):423-33.

99. Wagner J, Riwanto M, Besler C, Knau A, Fichtlscherer S, Roxe T, et al. Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(6):1392-400. Epub 2013/04/06.

100. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(6):463-6.

101. Hassanein M, Callison JC, Callaway-Lane C, Aldrich MC, Grogan EL, Massion PP. The state of molecular biomarkers for the early detection of lung cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5(8):992-1006.

102. Aaron J. Schetter SYL, Jane J. Sohn, Krista A. Zanetti, Elise D. Bowman, Nozomu Yanaihara, Siu Tsan Yuen, Tsun Leung Chan, , Dora L. W. Kwong GKHA, Chang-Gong Liu,

- George A. Calin, Carlo M. Croce, Curtis C. Harris,. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *The Journal of the American Medical Association*. 2008;299(4):425-36.
103. Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Tsujiura M, Morimura R, Nagata H, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *British journal of cancer*. 2011;105(1):104-11. Epub 2011/06/16.
104. Chen H, Liu H, Zou H, Chen R, Dou Y, Sheng S, et al. Evaluation of Plasma miR-21 and miR-152 as Diagnostic Biomarkers for Common Types of Human Cancers. *J Cancer*. 2016;7(5):490-9.
105. Samaan S, Khella HW, Girgis A, Scorilas A, Lianidou E, Gabril M, et al. miR-210 is a prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *J Mol Diagn*. 2015;17(2):136-44.
106. Do Canto LM MC, Willey S, Sidawy M, Da Cunha PA, Rone JD, Li X, Gusev Y, Haddad BR. MicroRNA analysis of breast ductal fluid in breast cancer patients. *International Journal of Oncology*. 2016;48(5): 2071–8.
107. Teplyuk NM, Mollenhauer B, Gabriely G, Giese A, Kim E, Smolsky M, et al. MicroRNAs in cerebrospinal fluid identify glioblastoma and metastatic brain cancers and reflect disease activity. *Neuro Oncol*. 2012;14(6):689-700.
108. Busacca S, Germano S, De Cecco L, Rinaldi M, Comoglio F, Favero F, et al. MicroRNA signature of malignant mesothelioma with potential diagnostic and prognostic implications. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2010;42(3):312-9. Epub 2009/06/09.
109. Balatti V MS, Ferracin M, Veronese A, Negrini M, Ferrocci G, Martini F, Tognon MG. MicroRNAs dysregulation in human malignant pleural mesothelioma. *Journal of Thoracic Oncology*. 2011;6(5):844 - 51.
110. Benjamin H, Lebanony D, Rosenwald S, Cohen L, Gibori H, Barabash N, et al. A diagnostic assay based on microRNA expression accurately identifies malignant pleural mesothelioma. *J Mol Diagn*. 2010;12(6):771-9.
111. Gee GV, Koestler DC, Christensen BC, Sugarbaker DJ, Ugolini D, Ivaldi GP, et al. Downregulated microRNAs in the differential diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2859-69.
112. Pass HI, Goparaju C, Ivanov S, Donington J, Carbone M, Hoshen M, et al. hsa-miR-29c* is linked to the prognosis of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res*. 2010;70(5):1916-24.
113. Santarelli L, Strafella E, Staffolani S, Amati M, Emanuelli M, Sartini D, et al. Association of MiR-126 with soluble mesothelin-related peptides, a marker for malignant mesothelioma. *PloS one*. 2011;6(4):e18232. Epub 2011/04/13.
114. Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, et al. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA*. 2007;13(10):1668-74. Epub 2007/08/19.
115. Andersen M, Grauslund M, Muhammad-Ali M, Ravn J, Sorensen JB, Andersen CB, et al. Are differentially expressed microRNAs useful in the diagnostics of malignant pleural mesothelioma? *APMIS*. 2012;120(9):767-9.
116. Cioce M, Ganci F, Canu V, Sacconi A, Mori F, Canino C, et al. Protumorigenic effects of mir-145 loss in malignant pleural mesothelioma. *Oncogene*. 2014;33(46):5319-31.
117. Ramirez-Salazar EG, Salinas-Silva LC, Vazquez-Manriquez ME, Gayosso-Gomez LV, Negrete-Garcia MC, Ramirez-Rodriguez SL, et al. Analysis of microRNA expression signatures in malignant pleural mesothelioma, pleural inflammation, and atypical mesothelial hyperplasia reveals common predictive tumorigenesis-related targets. *Exp Mol Pathol*. 2014;97(3):375-85.
118. Liang X, Zeng J, Wang L, Fang M, Wang Q, Zhao M, et al. Histone demethylase retinoblastoma binding protein 2 is overexpressed in hepatocellular carcinoma and negatively regulated by hsa-miR-212. *PloS one*. 2013;8(7):e69784. Epub 2013/08/08.

119. Mascaux C, Laes JF, Anthoine G, Haller A, Ninane V, Burny A, et al. Evolution of microRNA expression during human bronchial squamous carcinogenesis. *The European respiratory journal*. 2009;33(2):352-9. Epub 2008/11/18.
120. Pang Y, Young CY, Yuan H. MicroRNAs and prostate cancer. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2010;42(6):363-9. Epub 2010/06/12.
121. Andersen M, Grauslund M, Ravn J, Sorensen JB, Andersen CB, Santoni-Rugiu E. Diagnostic potential of miR-126, miR-143, miR-145, and miR-652 in malignant pleural mesothelioma. *J Mol Diagn*. 2014;16(4):418-30.
122. Cappellesso R, Nicole L, Caroccia B, Guzzardo V, Ventura L, Fassan M, et al. Young investigator challenge: MicroRNA-21/MicroRNA-126 profiling as a novel tool for the diagnosis of malignant mesothelioma in pleural effusion cytology. *Cancer Cytopathol*. 2016;124(1):28-37.
123. Ak G, Tomaszek SC, Kosari F, Metintas M, Jett JR, Metintas S, et al. MicroRNA and mRNA features of malignant pleural mesothelioma and benign asbestos-related pleural effusion. *Biomed Res Int*. 2015;2015:635748.
124. Kirschner MB, Cheng YY, Badrian B, Kao SC, Creaney J, Edelman JJ, et al. Increased circulating miR-625-3p: a potential biomarker for patients with malignant pleural mesothelioma. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2012;7(7):1184-91. Epub 2012/05/24.
125. Tomasetti M SS, Nocchi L, Neuzil J, Strafella E, Manzella N, Mariotti L, Bracci M, Valentino M, Amati M, Santarelli L Clinical significance of circulating miR-126 quantification in malignant mesothelioma patients. . *Clin Biochem* 2012;45:575-81.
126. Weber DG, Johnen G, Bryk O, Jockel KH, Bruning T. Identification of miRNA-103 in the cellular fraction of human peripheral blood as a potential biomarker for malignant mesothelioma--a pilot study. *PLoS One*. 2012;7(1):e30221.
127. Weber DG, Casjens S, Johnen G, Bryk O, Raiko I, Pesch B, et al. Combination of MiR-103a-3p and mesothelin improves the biomarker performance of malignant mesothelioma diagnosis. *PLoS One*. 2014;9(12):e114483.
128. Gayosso-Gómez L.V. GZ-G, P. Paredes-Garcia, R. Falfán-Valencia, M.E. Vazquez-Manríquez, L.M. Martinez-Barrera, P. Castillo-Gonzalez, U. Rumbo-Nava, R. Guevara-Gutierrez, B. Rivera-Bravo, A. Ramirez-Venegas, R. Sansores, M.C. Negrete-Garcia, B. Ortiz-Quintero. Identification of circulating miRNA profiles that distinguish malignant pleural mesothelioma from lung adenocarcinoma. . *EXCLI Journal* 2014.;13:740-50.
129. Han HS, Yun J, Lim SN, Han JH, Lee KH, Kim ST, et al. Downregulation of cell-free miR-198 as a diagnostic biomarker for lung adenocarcinoma-associated malignant pleural effusion. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2013;133(3):645-52. Epub 2013/01/29.