



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

“Evaluación del perfil de expresión de RNAs
pequeños en muestras de Mesotelioma Pleural
Maligno mediante secuenciación masiva”

Tesis para obtener el título de:
Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

Presenta:

Hernández López Ana Karen

Asesor:

Dr. Gaytán Cervantes Francisco Javier

Co Asesor:

Dra. Domínguez Rojas Maritere

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Evaluación del perfil de expresión de RNAs pequeños en muestras de Mesotelioma Pleural Maligno mediante secuenciación masiva

Que presenta la pasante: **Ana Karen Hernández López**
Con número de cuenta: **312222123** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de Enero de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	QFB. Nydia Berenice González Angeles	
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Evaluación del perfil de expresión de RNAs pequeños en muestras de Mesotelioma Pleural Maligno mediante secuenciación masiva

Que presenta la pasante: **Ana Karen Hernández López**

Con número de cuenta: **312222123** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de Enero de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	QFB. Nydia Berenice González Angeles	
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

U. N. A. M.

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el Trabajo de Tesis.

Evaluación del perfil de expresión de RNAs pequeños en muestras de Mesotelioma Pleural Maligno mediante secuenciación masiva

Que presenta la pasante: Ana Karen Hernández López
Con número de cuenta: 312222123 para obtener el título de: Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de Enero de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	_____
VOCAL	<u>QFB. Nydia Berenice González Angeles</u>	_____
SECRETARIO	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	
1er. SUPLENTE	<u>LBD. Larisa Andrea González Salcedo</u>	_____
2do. SUPLENTE	<u>Dra. María Eugenia Aranda Barradas</u>	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional [art. 127].



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Evaluación del perfil de expresión de RNAs pequeños en muestras de Mesotelioma Pleural Maligno mediante secuenciación masiva

Que presenta la pasante: **Ana Karen Hernández López**
Con número de cuenta: **312222123** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de Enero de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	_____
VOCAL	QFB. Nydia Berenice González Angeles	_____
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
1er. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	
2do. SUPLENTE	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Evaluación del perfil de expresión de RNAs pequeños en muestras de Mesotelioma Pleural Maligno mediante secuenciación masiva

Que presenta la pasante: **Ana Karen Hernández López**
Con número de cuenta: **312222123** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 15 de Enero de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	_____
VOCAL	QFB. Nydia Berenice González Angeles	_____
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
1er. SUPLENTE	LBD. Larisa Andrea González Salcedo	_____
2do. SUPLENTE	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Agradecimientos

En primera instancia quiero agradecerle a Dios por permitirme completar un sueño, una muestra más de su infinita gracia.

A mis padres, siendo consciente que no habrá alguna forma de agradecer su esfuerzo sobrenatural y tal magnitud de sacrificios, quiero reconocer que este logro también es de ustedes, gracias por siempre sostenerme cuando más lo necesitaba. Papá gracias por los desayunos de cada mañana, por quedarte conmigo mientras estudiaba, por ser mi mayor ejemplo de responsabilidad y entrega. Mamá gracias por tu dedicación, por darme todo sin medida, por ser mi mayor ejemplo de valentía y perseverancia.

A mi hermano, por ser mi complemento perfecto, mi eterno cómplice de travesuras, porque eres la persona más artística, gracias por tu disposición, por tolerarme y por tus ediciones en photoshop.

A mi familia, por sus palabras de aliento, gracias por estar presentes en los momentos más significativos y por jamás dejar de creer en mí.

A Eve, mi amix, por formar parte fundamental en esta etapa, gracias por infundirme motivación cuando creía no poder, por brindarme siempre tu apoyo y ser mi incondicional compañera de estudio, de lloraditas, por prepararme crepas y encerrarnos con candado todos los días.

A Karen y mis amigos de la universidad, por compartir momentos invaluable conmigo, por las risas, las bromas, por sus muestras de afecto y apoyo, porque simplemente hicieron de la universidad una etapa inolvidable.

A los doctores Carolina y Javier, por transmitirme sin medida sus conocimientos, por cada una de las oportunidades que me proporcionaron, porque más allá de una relación docente me brindaron su amistad, gracias por su infinita paciencia y el bullying laboral.

A mis profesores de la universidad, por todas sus enseñanzas, si bien, han sido ejemplo a seguir y pilar en mi formación académica.

Finalmente y no menos importante, a la máxima casa de estudios superiores, gracias UNAM, gracias FESC, fuiste mi segunda casa, me entregaste diversidad de conocimientos, experiencias y oportunidades inigualables, eternamente orgullosa de ser sangre azul y piel dorada.

Índice

1. Resumen	1
2. Abreviaturas	2
3. Introducción	2
3.1 ¿Qué es el cáncer?	2
3.2 Mesotelioma Pleural Maligno	2
3.2.1 Etiología	3
3.2.2 Incidencia	4
3.2.3 Diagnóstico.....	4
3.2.4 Tratamiento	5
3.3 Biomarcador	5
3.4 RNA pequeños	6
3.4.1 RNA asociados a proteínas PIWI	7
3.4.2 RNA nucleolares	9
3.4.3 Micro RNA	12
3.5 Micro RNA asociados a MPM.....	14
3.6 Secuenciación	16
4. Objetivo General	16
4.1 Objetivos específicos	16
5. Hipótesis	17
6. Justificación	17
7. Material y Métodos	18
7.1 Extracción de RNA	19
7.2 Cuantificación y evaluación de la calidad de RNA	20
7.3 Generación de las genotecas de TruSeq small RNA	22
7.4 Purificación de las genotecas	24
7.5 Cuantificación y evaluación de las genotecas	25
7.6 Secuenciación	30
8. Resultados	31
8.1 Evaluación de la calidad del RNA total.....	31
8.2 Determinación y purificación de las genotecas	37
8.3 Evaluación cuantitativa y cualitativa de las genotecas	39
8.4 Identificación de los perfiles de expresión	42
8.4.1 Evaluación de la calidad de los datos de secuenciación	43
8.5 Análisis de expresión diferencial	49
9. Discusión	54
10. Conclusiones	62
11. Perspectivas	63
12. Referencias	66

1. Resumen

El cáncer es un problema de salud pública, es la segunda causa de muerte a nivel mundial y la tercera causa de muerte en México. Existen diversos tipos de cáncer, dentro de los cuales el Mesotelioma Pleural Maligno (MPM) es responsable del 4% de muertes a nivel mundial. El MPM es un tipo de cáncer poco común y muy agresivo, su incidencia en México es de 500 casos por año y se estima que vaya en aumento. El diagnóstico de MPM es complejo y el tratamiento actual es deficiente, por lo que la búsqueda de nuevos biomarcadores que tengan un impacto en el manejo clínico de esta enfermedad es una necesidad.

Es en este escenario en donde el papel de los RNA pequeños, ha tomado importancia, debido a que se ha demostrado una relación entre la pérdida de su regulación con diferentes tipos de cáncer y el desarrollo de la enfermedad, debido a que estas moléculas tienen la capacidad de regular la expresión de diversos genes y por lo tanto se encuentran implicados en diferentes mecanismos neoplásicos. En el caso de MPM, hasta la fecha solo se ha reportado una clase RNA pequeños implicados en esta enfermedad, denominados micro RNAs.

Este es el primer trabajo que evalúa un perfil de expresión de las diferentes clases de RNA pequeños. La identificación de estos pequeños RNA, se llevó a cabo mediante secuenciación masiva, empleando 3 líneas celulares MRC-5 (Control sano), MSTO-211H y H2452 (Células neoplásicas) y muestras derivadas de pacientes con MPM.

Mediante el análisis bioinformático de los datos de secuenciación, se identificaron 24 RNAs pequeños que presentaron una pérdida en su regulación en cada muestra, y de éstos se seleccionaron los siguientes sncRNAs debido a que se encontraron presentes tanto en las líneas celulares neoplásicas, como en las muestras de pacientes con MPM: hsa-mir-196, hsa-let-7a-2, hsa-mir-378a, hsa-mir-182, hsa-miR-10b-5p, hsa-mir-183, hsa-mir-432, hsa-mir-143, hsa-piR-32678, SNORD114-12 y RNU5F-1, de los cuales algunos ya han sido reportados en diversos tipos de cáncer, por lo que entender su papel en el desarrollo de MPM será de suma importancia para entender el desarrollo de la enfermedad y poder proponer nuevos biomarcadores diagnósticos o pronósticos de la misma.

2. Abreviaturas

AD	Adenocarcinoma
5-FU	Fluorouracilo
AATF	Factor de transcripción antagonista de apoptosis
Ber-EP4	Anticuerpo de membrana epitelial
CDKN2A	Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina
CK	Citoqueratina
CO ₂	Dióxido de carbono
DGCR8	Subunidad del complejo microprocesador
EGR	Proteína de respuesta de crecimiento temprano 1
EMA	Antígeno epitelial de membrana
EMT	Transición epitelial-mesenquimal
FGF9	Factor de crecimiento de Fibroblastos
FU	Unidades de fluorescencia
H ₂ O	Agua
HGF	Factor de crecimiento de Hepatocitos
hTERT	Telomerasa transcriptasa inversa
InCan	Instituto Nacional de Cancerología
LAD	Adenocarcinoma pulmonar
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LMC	Leucemia mieloide crónica
lncRNA	RNA largo no codificante
MAPK3	Map cinasa 3
Min	Minuto
miRNA	micro RNA
mL	Mililitros
MPM	Mesotelioma Pleural Maligno
mRNA	RNA mensajero
N	Normal
NaOH	Hidróxido de Sodio
ncRNA	RNA no codificante

ng	nanogramos
nM	Nanomolar
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
piRNA	RNA asociado a proteínas PIWI
RB1	Proteína del retinoblastoma
RGS17	Regulador de la proteína G
RIN	Número de integridad de RNA
RISC	Complejo silenciador inducido por ARN
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	ribonucleoproteínas
RPM	Revoluciones por minuto
s	Segundos
sncRNA	RNA pequeño no codificante
snoRNA	RNA nucleolar
snRNA	RNA nuclear
SV40	Virus simio 40
tRNA	RNA de transferencia
TTF-1	Factor de transcripción Tiroide 1
µg	Microgramos
µl	Microlitros
UTR	Región no traducida
WT-1	Antígeno tumoral de Wilms
Zuc	Zucchini

3. Introducción

3.1 ¿Qué es el cáncer?

El cáncer es un conjunto de enfermedades complejas, que se caracteriza por la proliferación no controlada de células anormales lo que repercute en la homeostasis celular del organismo. Puede surgir a partir de cualquier tipo de célula irrumpiendo cualquier tejido corporal, su clasificación dependerá del tejido o célula de origen^{1,2}.

El cáncer es un problema de salud pública, actualmente representa uno de los mayores desafíos en este ámbito, puesto que afecta a toda la humanidad, tanto a hombres, mujeres, niños y adultos. Su incidencia y mortalidad va en aumento, de acuerdo con las estadísticas, el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, siendo el responsable de 9.6 millones de defunciones cada año. En México forma parte de las primeras 3 causas de muerte, con el 12.9% de todos los casos, equivalente a 85,201 defunciones. La estadística de incidencia y la prevalencia de cáncer en México es deficiente puesto que no se tiene un registro basado por población, sin embargo, se espera que la región de América Central y del Sur experimente un aumento en la incidencia de cáncer a 1.7 millones y se duplique tasa de mortalidad (500,000 a 1 millón) para 2030^{3,4,5}.

3.2 Mesotelioma Pleural Maligno

El mesotelio es una monocapa de células epiteliales, sostenidas sobre tejido conjuntivo, que recubren toda la superficie de las cavidades serosas (pleura, pericardio, el peritoneo y la túnica vaginal) y los órganos contenidos dentro de estas cavidades, en el caso de la pleura esta contiene a los pulmones, el peritoneo a los intestinos, el pericardio al corazón y la túnica vaginal a los testículos^{6,7}.

Las principales funciones atribuidas al mesotelio son de barrera protectora permitiendo el libre movimiento de los órganos y tejidos evitando la fricción entre ellos, así también tiene un papel importante en el transporte de fluidos, presentación de antígenos, inflamación y reparación de los tejidos⁶.

El mesotelioma maligno es una neoplasia agresiva, poco común que surge por una alteración patológica en las células del mesotelio en cualquiera de las

cavidades serosas anteriormente mencionadas, sin embargo, el sitio más común de origen es la pleura, del que deriva su nombre Mesotelioma Pleural Maligno (figura 1), el cual de ahora en adelante lo abreviaremos y nos referiremos como MPM ^{7,8}.

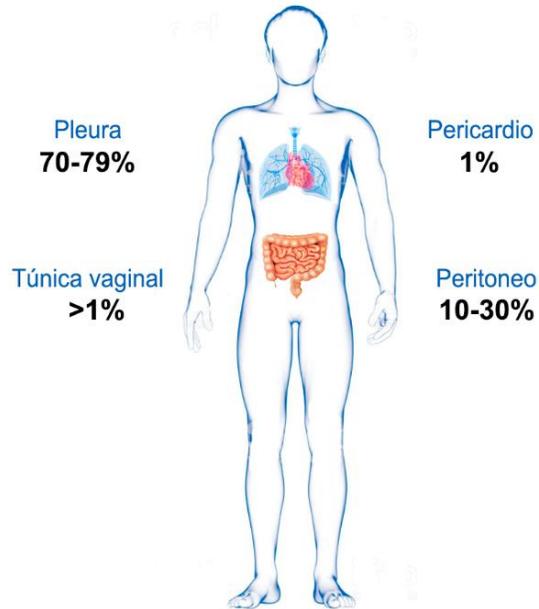


Figura 1. Frecuencia de Mesotelioma Maligno en las diferentes cavidades serosas; pleura corresponde al 70-79%, el peritoneo 10-30%, el pericardio al 1% y en la túnica vaginal menor al 1%.

El MPM es una neoplasia que es más común en hombres que en mujeres, y derivado de su clasificación histológica se puede dividir en 3 subtipos: Epitelial (tubulopapilar y epitelioide), Sarcomatoso (incluido el desmoplásico), Bifásico (mixto). El tipo epitelial es el subtipo más frecuente correspondiendo al 55-65% de los casos totales reportados; el 15-20% son mixtos y el 10-15% corresponden al tipo sarcomatoso^{7,9}.

3.2.1 Etiología

Se ha reportado que el factor de riesgo más importante en la etiología de MPM es la exposición al asbesto, ya sea por la práctica de profesiones implicadas al uso de este mineral o por una posible exposición de tipo ambiental, por ejemplo, cercanía a minas o fábricas donde se manipula este mineral, a través de contacto con la ropa de los trabajadores del asbesto, entre otros⁷.

Otros factores asociados a la etiología de MPM es la infección con el virus simio 40 (SV40) y la exposición a rayos ionizantes. Estas asociaciones aún no están del todo comprobadas, sin embargo, se han publicado algunos informes de mesoteliomas que se desarrollaron después de que los pacientes estuvieron expuestos a altas dosis de radiación en el pecho o en el abdomen como tratamiento para otro tipo de cáncer y en el caso del virus SV40 se ha reportado que es capaz de infectar y transformar a las células mesoteliales provocando una inactivación de los genes supresores tumorales como el gen p53 y el retinoblastoma 1 (RB1), incrementando la susceptibilidad de las células mesoteliales a otros carcinógenos^{8,10,11}.

3.2.2 Incidencia

La incidencia de MPM a nivel mundial es de 120 000 casos por año, siendo el responsable del 4% de muertes de cáncer, el cual ha ido incrementando con el transcurso de los años y se estima que siga aumentando. Tomando en cuenta un subregistro de certificados de defunción en México, se estima 500 casos por año, siendo el MPM el responsable de alrededor de 5500 muertes de 1979 a 2015^{9,12}.

Debido a que el asbesto solo se ha prohibido en determinados países, algunas naciones han hecho predicciones sobre la mortalidad debida a la exposición de asbesto y se esperan por año: 1000 casos en Australia, 2040 casos en el Reino Unido y 2800 casos en los Estados Unidos. Se deduce que la incidencia de los casos de MPM podría alcanzar su punto máximo entre 2010-2040^{13,14}.

Se ha reportado que la supervivencia media de los pacientes con MPM sin tratamiento es de 4 a 12 meses y con tratamiento menor a 16 meses^{7,15,16}.

3.2.3 Diagnóstico

El diagnóstico del MPM es complejo, debido principalmente a que la sintomatología clínica no es específica de la enfermedad, y suelen confundirse con alguna otra patología; sin embargo, los estadios avanzados se caracterizan por derrame pleural, dolor torácico y disnea¹⁷.

Dada la sintomatología presentada por los pacientes con MPM, se pueden realizar un examen de rayos X del tórax, el cual puede detectar la presencia de engrosamiento pleural que sugieren al diagnóstico de MPM, así también se puede llevar a cabo un examen citológico mediante el cual se examinan las células obtenidas del líquido pleural; sin embargo, no es del todo específico. La prueba para un diagnóstico más acertado de MPM consiste en un examen inmunohistoquímico del tejido pleural, el cual consta de la identificación de un conjunto específico de marcadores positivos y negativos de anticuerpos monoclonales, que incluyen como marcadores positivos a: calretinina, antígeno tumoral de Wilms 1 (WT-1), antígeno epitelial de membrana (EMA), citoqueratinas (CK5 o CK6) y como negativos: el marcador de membrana Ber-EP4 y el factor de transcripción tiroide 1 (TTF-1)¹⁸.

3.2.4 Tratamiento

Uno de los principales retos del estudio del MPM es la búsqueda de tratamientos óptimos para la erradicación de la enfermedad, ya que la eficacia de los tratamientos actuales se ve afectada debido a su diagnóstico en etapas tardías, la inespecificidad en la sintomatología clínica y la baja la eficacia de las terapias. Es por ello que se recomienda una terapia multimodal, es decir, una combinación de la cirugía con el objetivo de conseguir la mayor reducción tumoral, asociada a otro tratamiento complementario como la quimioterapia o radioterapia. La quimioterapia de primera línea con mayor eficacia reportada involucra el uso de pemetrex y cisplatino, sin embargo, la combinación de gemcitabina y carboplatino también es considerada una opción de primera línea aceptable ^{7,17,19}.

3.3 Biomarcador

Un biomarcador puede ser cualquier componente celular o molecular que pueda medirse e indicar un estado biológico, el cual puede asociarse; a la presencia o ausencia de un estado fisiológico y/o patológico, como un claro ejemplo determinar un estadio neoplásico; este último en el caso de cáncer. El biomarcador debe tener como cualidades una alta especificidad y sensibilidad, además de que su evaluación debe ser por métodos precisos y reproducibles²⁰.

Debido a que el diagnóstico del MPM como previamente se ha indicado es complejo, tardío, además de que los tratamientos actuales tienen una baja eficacia, es necesaria la búsqueda de nuevos biomarcadores que apoyen al pronóstico y/o diagnóstico de esta enfermedad. El uso de biomarcadores permitiría el desarrollo de nuevos enfoques dirigidos al diagnóstico como al tratamiento, con el objetivo de tener un impacto significativo en el manejo clínico de MPM.

Es en esta búsqueda de nuevos biomarcadores donde el papel de los RNA pequeños no codificantes toman relevancia como posibles biomarcadores en el MPM, puesto que se ha demostrado una estrecha relación entre la pérdida de la regulación de estos RNA pequeños no codificantes y el desarrollo de diversas patologías, como el cáncer²¹.

3.4 RNAs pequeños no codificantes (sncRNAs)

Se le denomina genoma humano al conjunto de todo el DNA que contiene una célula y los genes que ésta contiene, se estima que solo el 2% codifica a proteínas mientras que el 98% es no codificante, dentro de este último porcentaje se sabe ahora que alrededor del 80% del genoma no codificante es biológicamente activo y es aquí donde se encuentran los RNAs no codificantes, por sus siglas en inglés ncRNA (non-coding RNA). El descubrimiento de los ncRNA proporcionó una nueva forma de comprender los niveles de expresión y regulación de diversos genes. Este grupo de RNAs pueden dividirse en RNAs largos no codificantes lncRNAs (*long non-coding RNA*) y RNAs pequeños no codificantes sncRNAs (*small non-coding RNA*), esta clasificación se establece a partir de su tamaño^{22,23}.

Los sncRNAs tienen un tamaño aproximado entre los 19-32 nucleótidos, se ha reportado que se encuentran implicados en diversos procesos biológicos como: proliferación, crecimiento, especialización celular, migración, apoptosis, metabolismo y en mecanismos inmunológicos, además de ser reguladores fundamentales en el desarrollo y fisiología normal²⁴.

Los sncRNAs se han clasificado principalmente en: micro RNA (miRNA), RNA asociados a proteínas piwi (piRNA) y los RNA nucleolares (snoRNA), sin embargo, hasta la fecha se siguen descubriendo nuevas clases de sncRNA. Los pequeños RNA generalmente requieren de un proceso de maduración, es decir, provienen de precursores de RNA (pre-RNA, forma de RNA que contiene intrones y exones) y requieren de una maquinaria específica para su maduración²².

A continuación, se describirán cada clase de sncRNA, su papel biológico y su biogénesis.

3.4.1 RNA pequeños asociados a proteínas PIWI (piRNA)

Los piRNA tienen un tamaño aproximado de 24-32 nucleótidos y su función principal es el silenciamiento de los elementos transponibles (transposones); como su nombre lo indica, se caracterizan por estar asociados a un miembro de la familia de proteínas Argonautas llamada PIWI, la cual cuenta con actividad endonucleasa y ayuda a regular a los transposones. Los piRNA son moléculas muy estables debido a la presencia de un grupo metilo en su extremo 3' y tienen preferencia por la uridina en su extremo 5'. Poseen un papel muy importante en el desarrollo de las células germinales, particularmente en la espermatogénesis, además de participar en mecanismos transcripcionales y postranscripcionales^{25,26}.

La biogénesis de los piRNA comienza en el núcleo con la transcripción de regiones repetitivas intergénicas de cadena sencilla, denominadas *cluster* de piRNA, esta transcripción puede llevarse a cabo tanto río arriba, como río abajo originando como resultado piRNA primarios, los cuales posteriormente son exportados al citoplasma para su maduración. De aquí pueden surgir dos mecanismos, dependiendo el sentido de la transcripción: en el primer mecanismo, producto de la transcripción antisentido originando una cadena 3'-5' va a ser cortada

por la ribonucleasa Zucchini en el extremo 5', una vez que se haya escindido, al extremo 5' se incorpora una proteína PIWI, posteriormente una exonucleasa recortará a este complejo piRNA-PIWI hasta su longitud final. El extremo 3' del complejo contiene un grupo hidroxil que será metilado por Hen1, finalmente este producto ingresará al ciclo Ping-pong para posteriormente regresar al núcleo y bloquear la transcripción del gen objetivo. El segundo mecanismo; producto de la transcripción sentido da origen a una cadena 5'-3', es transportada al citoplasma en donde entrará directo al ciclo Ping-pong, la cadena 5'-3' se va a asociar a una proteína PIWI y va a reconocer a un objetivo complementario, posteriormente va a emplear la actividad de la proteína PIWI para cortar su extremo 5', lo que favorece el procesamiento de piRNA reversos secundarios. Como el nombre "Ping-pong" sugiere, el mecanismo se basa en que los piRNA 5'-3' se unen a una proteína PIWI, una vez formado el complejo son procesados por piRNA complementarios para producir a los piRNA 3'-5' secundarios, a través de un ciclo dependiente de la cadena complementaria (cadena sentido), los piRNA se amplifican y se acumulan en el citoplasma^{23,27} (figura 2).

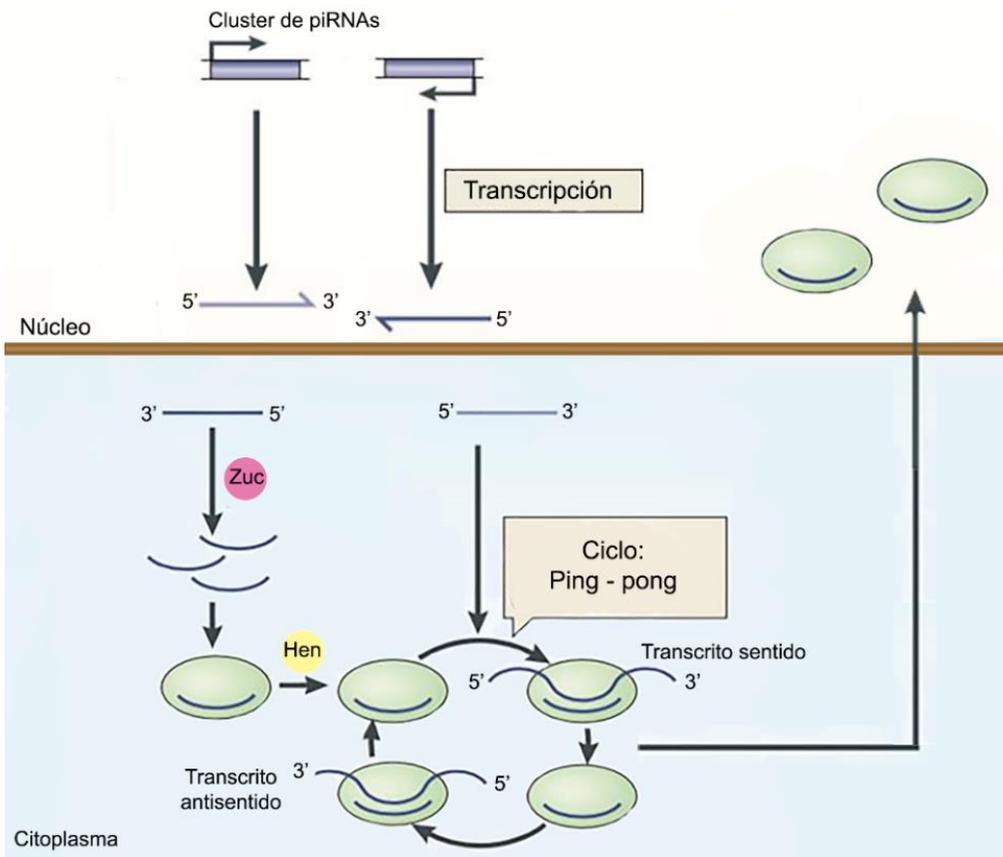


Figura 2. “Biogénesis de los piRNAs”: La biogénesis de los piRNA comienza con la transcripción (sentido o antisentido) de los cluster de piRNA, estos transcritos son transportados al citoplasma y dependiendo del origen de su transcripción pueden integrarse al ciclo de ping-pong en diferente etapa, si el transcrito proviene de la transcripción antisentido será procesado por la enzima Zuc la cual la cortará, para que pueda asociarse a una proteína PIWI, posteriormente Hen metilará la secuencia para que pueda ingresar al ciclo ping-pong, en el caso de los transcritos provenientes de la transcripción sentido, se unirán a proteínas PIWI y entraran directo al ciclo de ping-pong, los piRNA se amplifican y se acumulan en el citoplasma (Tomada y modificada de Mikiko *et al.* 2011).

Se ha reportado que la pérdida de la regulación de los piRNA afecta mecanismos como proliferación, apoptosis, invasión y migración de células cancerosas, es por ello que los piRNA pueden ayudar a distinguir entre un tejido tumoral y un tejido sano, considerándolos así como posibles biomarcadores de pronóstico y diagnóstico durante el desarrollo del cáncer²³.

En diferentes investigaciones se ha reportado una pérdida de la regulación de los piRNA en diferentes tipos de cáncer, por ejemplo, Chalbatani *et al.* (2019) reportaron que los piRNA: piR-34736, piR-36249, piR-35407 y piR-36318 están subexpresados en cáncer de mamá, así también identificaron otros piRNA con una

pérdida en su regulación negativa como el piR-55490 en cáncer pulmonar y el piR-015551 en cáncer colorrectal. Jia Cheng *et al.* (2011) reportaron que el piR-651 se encuentran subexpresados en diferentes líneas celulares de cáncer como MSTO-211H (mesotelioma), HELA (cáncer cervical) y NCI-14446 (cáncer de pulmón), entre otros^{28,29}.

3.4.2 RNAs nucleolares (snoRNA)

Los snoRNA tienen un tamaño aproximado de 60-300 nucleótidos, se acumulan principalmente en los nucleolos, y se encuentran implicados en diversos procesos como proliferación, crecimiento y regulación del ciclo celular, así también en la maduración y estabilización de la estructura 3D del RNA, participan en el ensamblaje de los ribosomas, la traducción de proteínas y el reconocimiento del RNA de transferencia³⁰.

Los snoRNA funcionan como una guía para la modificación química y procesos postranscripcionales del RNA ribosomal (rRNA). Esta clase pequeños RNA se dividen en dos categorías: snoRNA de caja C/D y snoRNA de caja H/ACA (figura 3), esta clasificación se basa en su estructura y cumplen diferentes funciones, en el caso de los snoRNAs C/D realizan la metilación de 2'-O-ribose, y los snoRNAs H/ACA dirigen la pseudouridilación de los nucleótidos^{22,31,30}.

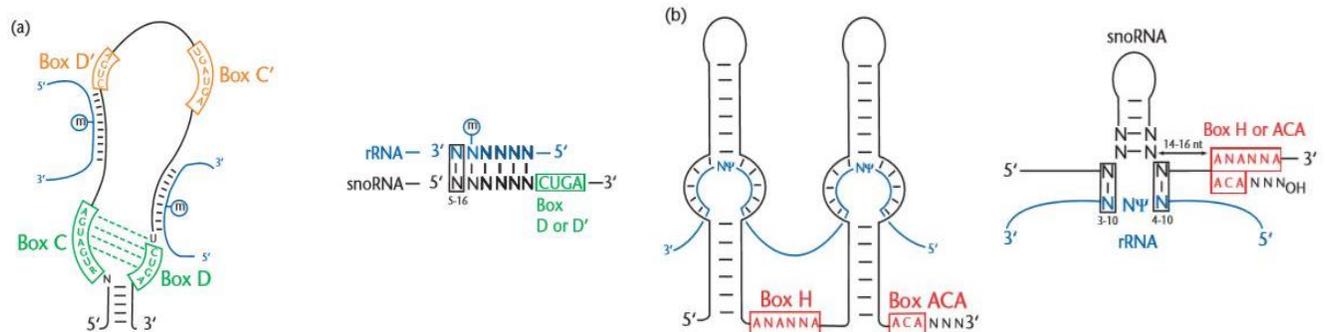


Figura 3. Estructura secundaria de los snoRNA. Con base en la estructura de los snoRNA se dividen en dos familias: A) Familia snoRNA C/D como su nombre lo indica, se caracteriza por tener motivos conservados C y D (marcados de color verde). B) Familia snoRNA H/ACA esta familia cuenta con una estructura de horquilla donde el motivo H y ACA se encuentran marcados de color rojo (tomada de Dragon *et al.* 2006).

La mayoría de las secuencias que codifican a los snoRNA, se encuentran en los intrones de transcritos codificantes; también se han identificado en regiones no codificantes, excepto por un pequeño número de snoRNA que son transcritos de manera autónoma por la RNA polimerasa II. La biogénesis de los snoRNA aún no está bien descrita, sin embargo, hay evidencia que comienza en el núcleo, a partir de la co-transcripción de genes que contienen en su secuencia a los snoRNA, la maduración de estos sncRNA está muy ligado al proceso de *splicing*, ya que en este último proceso se genera un intermediario de reacción llamado lariat (intrón que sufrió *splicing*), que es donde radica la secuencia de los snoRNA, el lariat pasará por una digestión de tipo exonucleolítica que dará origen a esta clase de pequeño RNA. El proceso de maduración involucra el reclutamiento de ribonucleoproteínas (RNP) que se van a asociar a los snoRNA formando complejos de proteínas y RNA, denominado snoRNP, por sus siglas en inglés (*small nucleolar ribonucleoprotein*), estas proteínas son críticas para proporcionarle estabilidad, además de transportar a los cuerpos de Cajal a los snoRNP en donde se llevará a cabo mecanismos de procesamiento y maduración adicionales³⁰ (Figura 4).

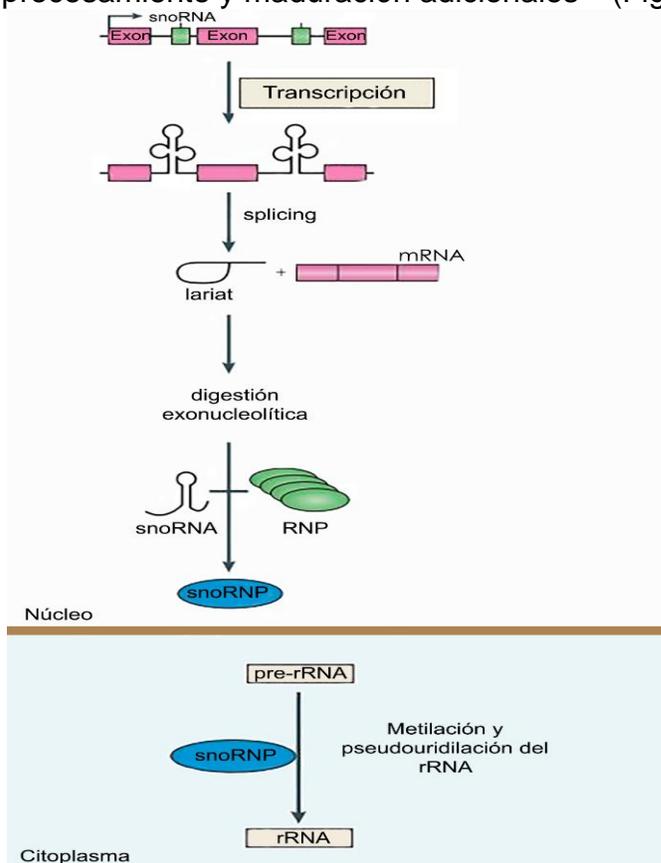


Figura 4. “Biogénesis de los snoRNA”: La biogénesis de los snoRNA comienza con la transcripción de regiones que contienen a los snoRNA, cuando se origina el pre-mRNA, para producir al mRNA se lleva a cabo el proceso de *splicing* y es aquí en donde surgen estructuras llamadas *lariat* (estructura donde radican los snoRNA), el lariat posteriormente pasará por una digestión de tipo exonucleolítica que dará como producto a los snoRNA. Los snoRNA para llevar a cabo sus funciones se necesitan asociar a proteínas RNP, una vez que se ha llevado esta asociación los snoRNP pueden actuar metilando o pseudouridilando al RNA ribosomal (tomada y modificada de Manel E. *et al.* 2011).

La expresión de los snoRNA es única, por lo que la pérdida de la regulación de estas moléculas podría sugerir una relación muy estrecha con alguna patología³¹. Así también hay evidencia que demuestra que la presencia de mutaciones en los snoRNA favorece procesos de transformación celular, tumorigénesis y metástasis, por lo que los snoRNA podrían proponerse como potenciales biomarcadores en el cáncer y ser blanco de tratamientos. Tal es el caso del snoRNA U50, este snoRNA se encuentra en el cromosoma 6q14.3, el cual presenta una translocación en las células de linfoma B, así también se encuentra subexpresado en cáncer de próstata y una sobreexpresión en cáncer de pulmón. Dong *et al.* (2009) demostraron también su implicación en cáncer de mama, Xiao Yang *et al.* (2017) encontraron una pérdida en la regulación positiva de los snoRNA: snoRA15, snoRA40 y snoRA41 en cáncer colón rectal y Kazuhiro Yoshida *et al.* (2017) encontraron el snoRA21 subexpresado en cáncer colón rectal proponiéndolo como un potencial biomarcador^{22,30,32,33,34}.

3.4.3 Micro RNA (miRNA)

Los miRNA tienen un tamaño aproximado de 20-25 nucleótidos. Poseen un papel muy importante en la regulación de la expresión de distintos genes, por lo que se ha reportado que están implicados en diversos procesos celulares, como la proliferación, la apoptosis, el crecimiento y la diferenciación celular.

La biogénesis de los miRNA como se puede observar en la figura 5, comienza en el núcleo de la célula, con la transcripción de los miRNA por la RNA polimerasa II, en donde surgen los precursores primarios denominados pri-miRNA. Los pri-miRNA tienen una longitud de 60-100 nucleótidos, tienen una estructura de horquilla, protuberancias internas y son bicatenarios. Éstos van a ser procesados para formar precursores más cortos por un complejo proteico denominado DGCR8-Drosha el cual está conformado por la proteína subunidad del complejo microprocesador por sus siglas en inglés (DGCR8) y una RNAsa de nombre Drosha, originando un producto de un tamaño de 70 nucleótidos denominado pre-miRNA, finalizada la formación del pre-miRNA es transportado al citoplasma por una proteína llamada exportina 5. Este producto una vez en el citoplasma, es cortado

por una enzima llamada Dicer, que generará como producto al miRNA maduro que sigue siendo un dúplex, con un tamaño de 22 nucleótidos. Los miRNA maduros son reclutados por un complejo de proteínas llamado miRISC o RISC, la doble hebra del miRNA maduro se va a disociar y el complejo miRISC va a retener a una única hebra denominada hebra guía, esta es la que va a reconocer la región 3'UTR del mRNA blanco. Es de suma importancia tener presente que la hebra guía cuenta con una secuencia denominada semilla (2-8 nucleótidos), ésta debe ser estrictamente complementaria al mRNA diana. Las secuencias semilla se conservan en muchas especies y existe variación dependiendo de los genes que regulan, y generalmente se utilizan para clasificar familias de miRNA. Finalmente, la unión del miRNA a su mRNA diana induce el bloqueo de la traducción por tres posibles mecanismos: represión de la traducción, degradación del mRNA y desestabilización del mRNA^{35,36}.

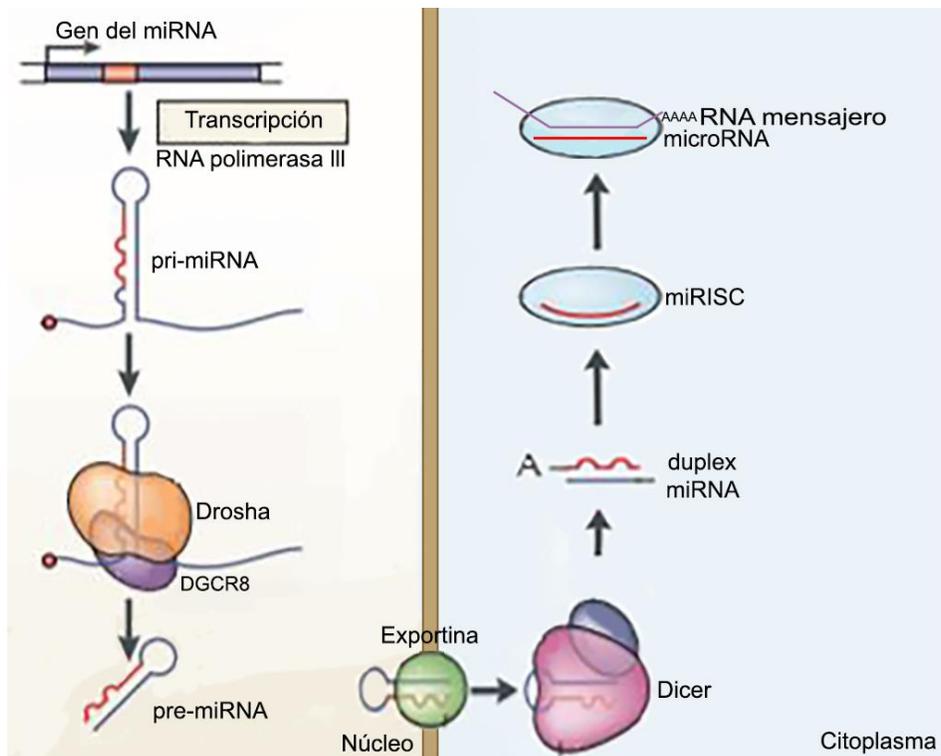


Figura 5. “Biogénesis de los microRNA: La biogénesis de los microRNA comienza con la transcripción de los genes que codifican para estos, dando origen al pri-miRNA que este posteriormente será cortado por el complejo proteico Drosha-DGCR8 que dará como producto al pre-miRNA, el cual será exportado al citoplasma por exportina 5, en el citoplasma el pre-miRNA volverá a ser cortado pero ahora por el complejo proteico Dicer que dará origen a un duplex de miRNA maduro, este duplex se disociará y el complejo miRISC llevará la hebra guía al RNA mensajero para que el miRNA cumpla su función (Tomada y modificada de Mikiko *et al.* 2011).

Los miRNA son ampliamente reconocidos por su implicación en la modulación de numerosas vías de señalización en diversas enfermedades, incluyendo distintos tipos de cáncer; se ha propuesto que los miRNA podrían actuar como oncogenes o supresores de tumores en procesos neoplásicos. La expresión anormal de los miRNA se ha asociado a varios mecanismos como proliferación, apoptosis, angiogénesis, transición epitelial-mesenquimal por sus siglas en inglés (EMT), metástasis^{22,37}.

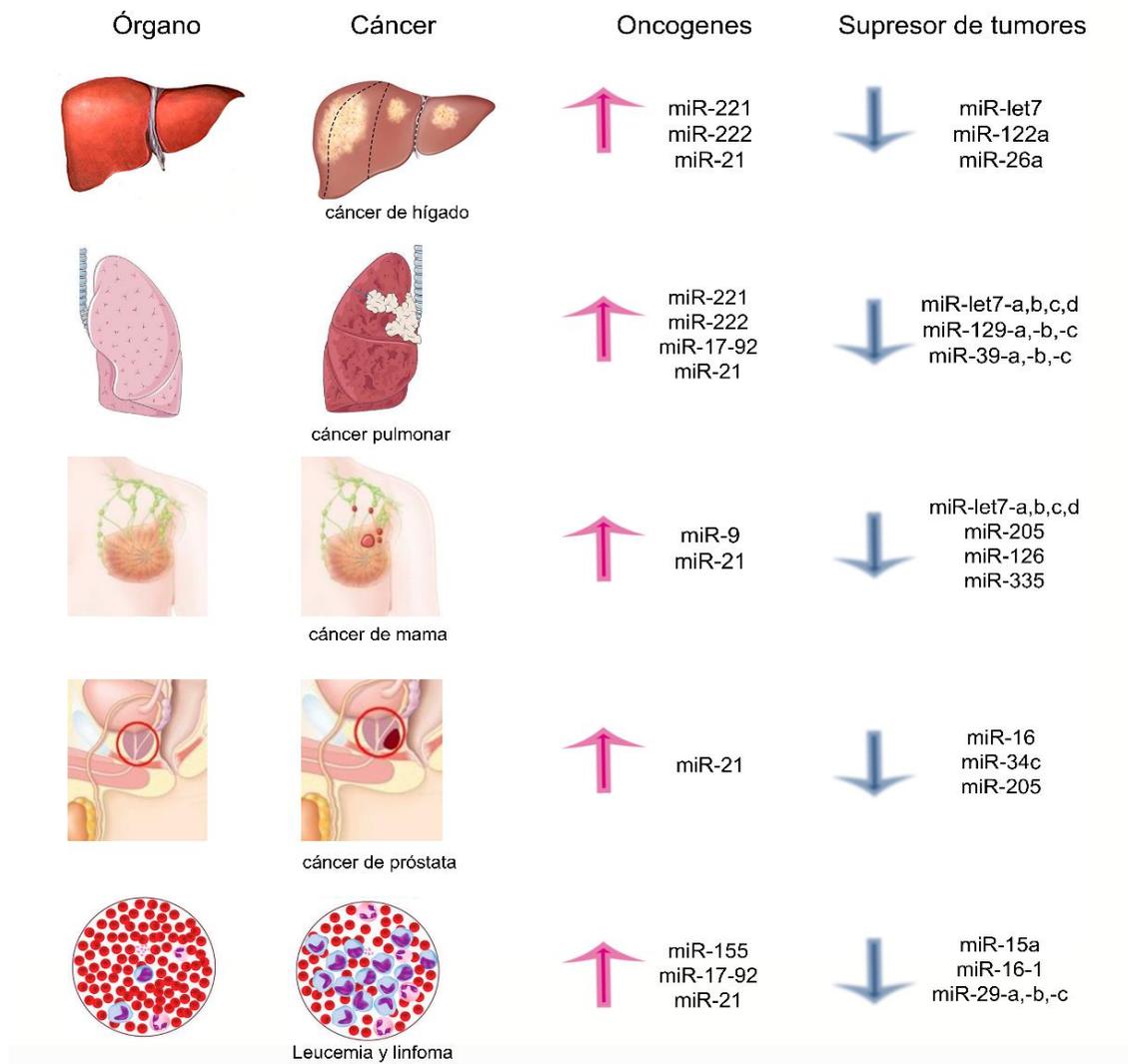


Figura 6. "miRNA como oncogenes y supresores de tumores en diferentes tipos de cáncer". Los miRNA forman parte fundamental de la regulación génica, por ello se les ha encontrado implicados en diversos tipos de cáncer como linfoma, leucemia, hepático, pulmonar, mama, prostático, ya sea como oncogenes o supresores de tumores (tomada y modificada de Satya K. *et al.* 2010).

Ya se han reportado algunos miRNA cuyo cambio en los niveles de expresión, es fundamental para determinar su papel como posibles oncogenes o supresor de tumores, como se observa en la figura 6. Tal es el caso de miR-21, el cual se ha encontrado sobre expresado en cáncer de mama, cerebro, hígado, próstata, pulmón, leucemia, linfoma, páncreas, glioblastoma y neuroblastoma. El miR-21 se encuentra implicado en la proliferación, en la apoptosis, la migración, la invasión y el mantenimiento de las células tumorales in vitro, la familia let-7, son miRNAs supresores de tumores, se ha reportado que la sub expresión de estos en varios tipos de cáncer como ovario, próstata, pulmón, mamá, páncreas, melanoma, mesotelioma y linfoma^{37,38}.

3.5 Importancia de los miRNA en MPM

Como se ha descrito anteriormente los sncRNA poseen gran impacto en el estudio del cáncer, es por ello que se ha centrado especial atención en ellos, en el caso del MPM no hay ningún reporte hasta la fecha que englobe otras clases de sncRNA además de los miRNA. A continuación, se describirán algunos de los miRNA reportados en MPM.

El primer estudio dirigido a la evaluación de la expresión de miRNA en MPM fue en el 2009, realizado por Mohamed Guled *et al.* en donde analizaron 17 muestras de tejido pleural congelado de pacientes con MPM, mediante microarreglos. Reportaron 12 miRNA sobre expresados (let-7b, miR-1228, miR-195, miR-30b, miR-32, miR-345, miR-483-3p, miR-584, miR-595, miR-615-3p, y miR-885-3p y nueve bajo subexpresados let-7e, miR-144, miR-203, miR-340, miR-34a, miR-423, miR-582, miR-7-1 y miR-9). Así también compararon la expresión de los miRNA entre las muestras MPM, encontrando 7 miRNA que se expresaron exclusivamente en el subtipo epiteloide, cinco en el subtipo bifásico y tres en el subtipo sarcomatoide. Posteriormente realizaron un análisis bioinformático en donde determinaron genes blanco de los miRNA; este análisis arrojó sus potenciales blancos que incluyen a los genes supresores de tumores CDKN2A, RB1 y NF2, y a los oncogenes EGR, HGF³⁹.

En 2013, G. Reid *et al.* analizaron muestras embebidas en parafina de muestras derivadas de pacientes con MPM, como de tejido normal, así también de líneas celulares, encontrando a la familia miR-15 sub expresada en las muestras de pacientes así como en las líneas celulares en comparación del tejido normal, proponiéndolo como un posible blanco terapéutico⁴⁰.

Morten Andersen *et al.* (2014) analizaron muestras embebidas en parafina derivadas de pacientes con MPM y las compararon con tejido no neoplásico, encontrando a los siguientes miRNA bajo regulados: miR-378, miR-365a, miR-193a-3p, miR-193b, miR-210, let-7c, miR-99a, miR-126, miR143, miR-145, miR-144-5p, miR-451a, miR-486-5p y miR-652. Sin embargo, los que presentaron una mayor relevancia fueron los miR-126, miR-143, miR-145 y miR-652, los cuales se validaron concluyendo que esto miRNA podrían fungir como un biomarcador, lo que mejoría en gran medida el diagnóstico de MPM⁴¹.

En México, Gayosso Gómez *et al.* (2018) mediante secuenciación masiva realizaron un perfil de expresión de miRNA en 22 muestras de suero derivadas de pacientes con MPM, 36 muestras de suero derivadas de pacientes con Adenocarcinoma (AD) y 45 muestras sanas. Obtuvieron como resultado del análisis comparativo de pacientes con MPM contra AD, una sobre regulación de 13 miRNA (hsa-miR-1292-5p, hsa-140-5p, hsa-miR-184, hsa-miR-1908, hsa-miR-23b-5p, hsa-miR-3198, hsa-miR323b-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-409-5p, hsa-miR-4683, hsa-miR-4707-3p, hsa-miR505-5p, hsa-miR-5706) y una sub expresión de los miRNA: hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-216b, hsa-miR-23c, hsa-miR-29b-3p. Concluyeron que podrían fungir como posibles biomarcadores de diagnóstico para el MPM los siguientes miRNA: hsa-miR-1271, hsa-miR-96-5p y hsa-miR-409 debido a su posible asociación con mecanismos de carcinogénesis. Sin embargo, la desventaja de este estudio es la falta de validación cuantitativa de los resultados de la secuenciación⁴².

3.6 Secuenciación como herramienta para el estudio de los sncRNA

Debido a la falta de reportes de las diferentes clases de sncRNA en el MPM, es necesario emplear una herramienta que nos permita su estudio, como es la

secuenciación masiva. Esta tecnología proporciona la capacidad de búsqueda de genes, mutaciones y niveles de expresión causantes de patologías desde varios enfoques, como el análisis y la cuantificación del RNA expresado en los tejidos o células incluyendo mRNA, ncRNA (lncRNA y sncRNA).

Una vez obtenidos los datos de secuenciación es necesaria la evaluación de la calidad de los datos y su posterior análisis.

4. Objetivo General

Identificar el perfil de expresión de RNAs pequeños en muestras derivadas de pacientes con MPM y en líneas celulares MRC-5, MSTO-211H y H2452, con el fin de determinar sus probables blancos y mecanismos en los cuales participan, mediante secuenciación masiva y análisis bioinformático.

4.1 Objetivos Específicos

- a) Extraer el RNA total de muestras derivadas de pacientes con MPM y de 3 líneas celulares (MRC-5, MSTO-211H y H2452).
- b) Evaluar la calidad del RNA total obtenido de las muestras derivadas de pacientes con MPM y de las líneas celulares (MRC-5, MSTO-211H y H2452).
- c) Generar y evaluar la calidad de las genotecas de los RNAs pequeños a partir del RNA total de muestras derivadas de pacientes con MPM y de las líneas celulares (MRC-5, MSTO-211H y H2452).
- d) Llevar a cabo la secuenciación de las genotecas de muestras derivadas de pacientes con MPM y de las líneas celulares (MRC-5, MSTO-211H y H2452), mediante una plataforma basada en el método de secuenciación por síntesis.
- e) Analizar los datos derivados de la secuenciación mediante análisis bioinformático empleando el software Strand NGS.

5. Hipótesis

El MPM es un tipo de cáncer poco frecuente, el diagnóstico es complejo y el tratamiento es ineficaz, por ello, la obtención de un perfil de expresión de RNAs pequeños mediante secuenciación masiva y su respectivo análisis bioinformático

nos ayudará a la identificación nuevos marcadores pronósticos, diagnósticos y/o blancos terapéuticos potenciales para un mejor manejo clínico de la enfermedad.

6. Justificación

El cáncer ocupa el tercer lugar como causa de mortalidad en México, siendo el MPM responsable de 500 casos anuales. Este tipo de cáncer es poco frecuente, de difícil diagnóstico y el tratamiento de primera línea actual tiene una eficacia baja, por ello la búsqueda de nuevos marcadores de diagnóstico, pronóstico y blancos terapéuticos es de suma importancia. Es en este contexto donde el papel de los RNAs pequeños toma relevancia, ya que diversos reportes indican que la pérdida de su regulación forma parte fundamental en el desarrollo del cáncer, por lo que su identificación podría ofrecernos nuevas estrategias para el manejo clínico de la enfermedad.

7. Material y Métodos

Muestras de pacientes con MPM

El proyecto se realizó en colaboración con el Instituto Nacional de Cancerología (InCan). La Dra. Saé Muñiz proporcionó las muestras de los pacientes diagnosticados con Mesotelioma Pleural Maligno.

Se obtuvieron 11 muestras derivadas de pacientes con MPM, la información de los pacientes diagnosticados en el InCan, se describe en la tabla 1.

Tabla 1: Características generales de la población de pacientes total, información proporcionada por el InCan.

Características	n/11 (%)
Edad (Media \pm DS, años)	60 (\pm 11 años)
<60 años	6 (54.5)
>61 años	5 (45.5)
Género	
Masculino	9 (81.8)
Femenino	2 (18.2)

Exposición a asbestos	
Si	4 (36.4)
No	7(63.6)
Historial tabáquico	
Si	4 (36.4)
No	7(63.6)
Exposición a humo de leña	
Si	2 (18.2)
No	9 (81.8)
ECOG	
<2	4 (36.4)
3-4	7 (63.6)
Histología	
Epitelial	11 (100)
Otras	0 (0)
Tratamiento	
Gemcitabina	11 (100)

Líneas celulares

Se emplearon 3 líneas celulares (MRC-5, MSTO-211H y H2452), utilizando como control sano la línea celular MRC-5 de origen pulmonar, las líneas celulares MSTO-211H y H2452 proceden de Mesotelioma, todas mantenidas en condiciones estándar de cultivo celular a 37°C y al 5% de CO₂, en medio Eagle mínimo esencial (EMEM) complementado con suero fetal bovino (SFB) y antibiótico Penicilina-Estreptomicina (Tabla 2).

Tabla 2: Características generales de las líneas celulares, información proporcionada por el InCan.

Línea celular	Procedencia	Medio de cultivo	Número de pases
MRC-5	Fibroblastos de pulmón sano	EMEM 10% SFB +0.2% de PEs	P6

H2452	Epitelio pulmonar Mesotelioma	RPMI 10% SFB +0.2% de PEs	P2
MSTO- 211H	Efusión pleural de pulmón Mesotelioma bifásico	RPMI 10% SFB +0.2% de PEs + alto contenido de glucosa	P4

7.1 Extracción de RNA total

La extracción de RNA total de las líneas celulares se realizó mediante el kit RNA/DNA/Protein Purification Plus Kit (Norgen Biotek Product, No. Cat. # 47700), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cultivos celulares para la extracción cumplían con un 80% de confluencia celular. Brevemente la metodología fue la siguiente: se aspiró el medio de cultivo, seguido de un lavado con 1ml de PBS 1x, posteriormente se agregó buffer SKP para favorecer la lisis de las células, la cual se llevó de forma mecánica empleando una aguja unida a una jeringa (se repitió de 5-10 veces). Una vez obtenido el lisado de las células se colocó en la columna de purificación de DNA. La columna se centrifugó a 5.200 x g (8.000 RPM) durante 1 minuto, en la resina de la columna de purificación se quedó adherido el DNA y en el sobrenadante el RNA y las proteínas.

En una nueva columna de purificación se colocó el sobrenadante del paso anterior y se agregaron 60 µl de etanol al 100% por cada 100 µl de muestra, la cual se centrifugó 2 minutos a 3,500 x g (~ 6,000 RPM). El RNA se quedó adherido en la resina de la columna de purificación. Posteriormente, se realizaron 3 lavados a la columna con 400 µl de la solución de lavado A y se centrifugó a 3,500 x g (~ 6,000 RPM). Se desechó el sobrenadante y la columna se centrifugó nuevamente a 14,000 x g (~ 14,000 RPM) durante 2 minutos para eliminar restos de la solución de lavado.

El RNA se eluyó agregando 50 µl de agua grado biología molecular a la columna y se centrifugó durante 2 minutos a 200 x g (~ 2,000 RPM), seguido de 1 minuto a 14,000 x g. El RNA total obtenido se almacenó a -80°C hasta su cuantificación y evaluación.

7.2 Cuantificación y evaluación de la calidad de RNA

El RNA total obtenido de las líneas celulares se cuantificó mediante NanoDrop, el cual se basa en espectrofotometría y su integridad se evaluó a través del análisis electroforético digital utilizando el equipo Bioanalyzer y el kit Agilent RNA 6000 Nano Kit (# reorde-no 5067-1511), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este equipo nos da el valor su integridad, por sus siglas en ingles RIN (RNA Integrity Number) de cada una de ellas, para estimar su nivel de degradación.

Brevemente, la metodología para evaluar la calidad del RNA consistió en colocar la estación de soporte del chip, ajustando su base en la posición C indicada en la estación (figura 7A). Los reactivos del kit se colocaron previamente 30 min a temperatura ambiente para equilibrarlos, pasados los 30 minutos se llevó a cabo la preparación de la mezcla de tinción de la matriz de electroforesis; a la matriz se le agregó el colorante del kit para su tinción (por cada 300 μ l de matriz se agregaron 15 μ l de colorante), el concentrado de matriz se resuspendió en vortex suavemente y se transfirió a una columna de filtrado, la cual se centrifugó a 13000 g por 10 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se llevó a cabo el cargado de la matriz en un chip de RNA 6000 nano colocado en la estación del chip, se agregaron 9 μ l de la matriz teñida de electroforesis en el pozo marcado en la posición indicada por una G (encerrada en un círculo). Se verificó que el émbolo estuviera a 1 mL y se cerró la estación. Se presionó el émbolo de la jeringa hasta que quedara sujeto por el clip de la estación de chip y pasados 30 segundos se liberó el clip de la estación de chip. Para liberar la presión, después de 5 segundos se regresó el émbolo a la posición de 1 mL, en este momento se procedió a colocar 9 μ l del gel teñido en los pozos marcados con una G.

Se procedió a cargar el marcador de RNA colocando 5 μ l en los 12 pozos indicados para las muestras y en el pozo marcado por una escalera. Finalmente se llevó a cabo el cargado del marcador de peso molecular y de las muestras, añadiendo 1 μ l del marcador de peso molecular en el pozo señalado por una escalera, en el caso de las muestras se agregó 1 μ l a cada uno de los 11 pozos designados para cada muestra (figura 7B).

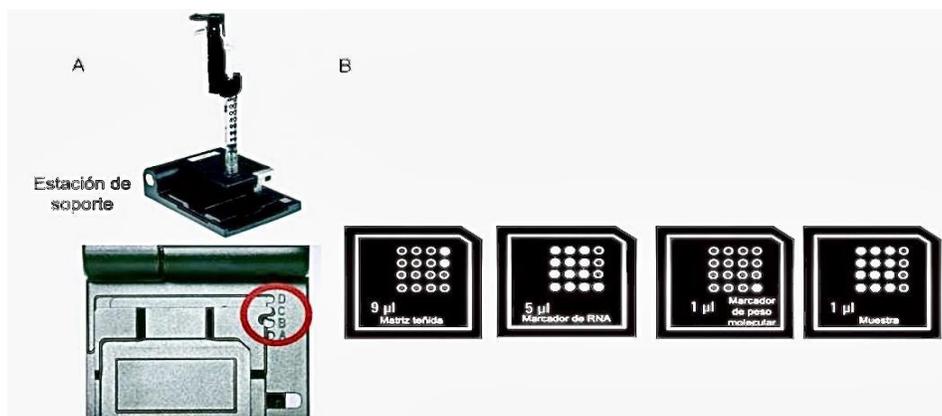


Figura 7. “Análisis electroforético digital mediante Bioanalyzer”. A) Estación del soporte del chip. B) chip de RNA 6000 nano

Se colocó el chip en un IKA vortex para su resuspensión durante 1 minuto a 2400 rpm y finalmente el chip se colocó en el Bioanalyzer Agilent 2100.

La cuantificación y evaluación del RNA obtenido de las muestras de pacientes de MPM se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó el equipo TapeStation 4200 y el kit High Sensitivity RNA 1000 Reagent Agilent Technologies. Para ello, se colocó 2 µl de la muestra de RNA (un tubo por cada muestra) y 1 µl de HS RNA Buffer proporcionado por el kit, posteriormente se resuspendió 2000 rpm por 1 min en un IKA vortex. Finalmente se colocó en el equipo TapeStation 4200.

7.3 Generación de las genotecas de TruSeq small RNA

La generación de las librerías se realizó empleando el protocolo TruSeq small RNA (illumina, No. Cat. # 15004197 v02) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se generaron 11 genotecas derivadas de las muestras de RNA total de pacientes con MPM y 3 genotecas derivadas de las líneas celulares. Durante el procedimiento se empleó un control positivo comercial de RNA total de cerebro (Life Technologies No. Cat. # AM7962). El protocolo está dividido en 4 etapas principales, que a continuación se describen.

Etapa 1: Ligación de los adaptadores (3')

La primera etapa consiste en la ligación de los adaptadores, en este paso al extremo 3' de las muestras de RNA, se ligaron secuencias específicas de RNA conocidas

como adaptadores, esto se llevó a cabo con 1 μ l del adaptador 3' (RAE3) y 1 μ g de RNA total diluido en 5 μ l de agua libre de nucleasas, la mezcla se incubó a 70°C durante 2 minutos y se colocó en hielo.

En otro tubo de PCR (previamente colocado en hielo), se llevó a cabo una mezcla de reacción agregando 2 μ l de Buffer de ligación (HML), 1 μ l de Inhibidor de RNAsa y 1 μ l de T4 RNA ligasa mutada [Epicentre 10,000 units for up to 50 libraries, No. Cat. #LR2D11310K]. Se homogenizó gentilmente y se agregaron los 4 μ l de la mezcla de reacción a los 6 μ l de la mezcla RAE3-RNA, se mezcló e incubó a 28°C durante 60 minutos en un termociclador (previamente precalentado), una vez terminados los 60 minutos se adicionó 1 μ l de la solución de paro (STP), se homogenizó y se continuó con la incubación por 15 minutos más a 28°C y finalmente se colocó en hielo.

Etapa 2: Ligación de los adaptadores (5')

La ligación en el extremo 5' en un tubo de PCR (previamente en hielo), se agregó 1 μ l del adaptador 5' de RNA (RAE5) por muestra, se incubó a 70°C por 2 minutos y se colocó en hielo. Se le adicionó 1 μ l de ATP 10 nM, 1 μ l de T4 RNA ligasa y se adicionaron los 3 μ l al tubo con RAE3-RNA y se mezcló. Finalmente se incubó a 28°C durante 60 minutos en un termociclador (previamente precalentado), pasado el tiempo se removió y se colocó en hielo.

Etapa 3: Retrotranscripción

En la segunda etapa se llevó a cabo una transcripción reversa (RT), la cual consiste en la conversión de RNA en DNA complementario (cDNA), las cuales posteriormente fueron amplificadas por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, en un tubo de PCR (previamente en hielo), se colocaron 6 μ l de la genoteca obtenida RAE3-RNA-RAE5 (el restante se almacenó a -20°C) y 1 μ l de RNA RT primer, se homogenizó y se centrifugó a 1000 rpm por 5 segundos. Se incubó a 70°C por 2 minutos y se colocaron en hielo.

Se llevó a cabo una mezcla de reacción en un nuevo tubo de PCR, se añadió 2 μ l del Buffer 5X, 0.5 μ l dNTP 12.5mM, 1 μ l de DTT 100mM, 1 μ l del inhibidor de RNAsa

y 1 µl de la Transcriptasa reversa SuperScript II (Life Technologies 18064-014). Se agregaron los 5.5 µl de la mezcla de reacción al tubo que contiene el RNA-RTprimer. Se incubó a 50°C por 60 minutos en un termociclador (previamente precalentado), pasado el tiempo se removió y se colocó en hielo. En este punto se tuvieron listas las genotecas ensambladas.

Etapa 4. Amplificación de las genotecas

Una vez finalizada la retrotranscripción, el cDNA se amplificó mediante PCR, para ello, se llevó a cabo una mezcla de reacción en un tubo de PCR, se agregó 8.5 µl de agua ultra pura, 25 µl de PCR mix (PML), 2 µl de RNA PCR primer index (RP1) y 2 µl RNA PCR primer index (RPIX). Se adicionó 31.5 µl de la mezcla de reacción al tubo con las genotecas. Se utilizó el siguiente programa de PCR para su amplificación

- 98°C por 30 segundos
- 11 ciclos de:
 - 98°C por 10 segundos
 - 60°C por 30 segundos
 - 72°C por 15 segundos
- 72°C por 10 minutos
- 4°C hold

Se almacenó a -80°C hasta su purificación.

7.4 Purificación de las genotecas

Purificación de las genotecas por selección de tamaño en geles de acrilamida

La purificación de las genotecas se llevó a cabo mediante electroforesis en geles al 6% de acrilamida TBE gel (invitrogen by Thermo Fisher Scientific, No. Cat. #EC6265BOX) y se emplearon 2 marcadores de peso molecular HRL (el cual contiene fragmentos de 500 pb a 100 pb, es un marcador de alta resolución) y CRL (contiene fragmentos de 140pb y 160 pb, marcador de RNA a diseño). Se pre-corrió el gel 5 durante minutos a 100 volts. Posteriormente se realizó el cargado de las

genotecas y se siguió el siguiente programa de electroforesis: 40 minutos a 80 volts y 20 minutos a 110 volts. Los geles fueron teñidos con Sybr green (invitrogen by Thermo Fisher Scientific 10,000X concentrate in DMSO, No. Cat. S7567) y visualizados en un transiluminador y así poder observar el tamaño de la genoteca. Finalmente se cortaron las bandas que correspondían a las genotecas de las líneas celulares y de las muestras derivadas de pacientes con MPM.

Purificación de las genotecas

Las bandas obtenidas al cortar el gel, correspondientes a las genotecas de sncRNA se transfirieron a tubos de ruptura (braker, IST Engineering No. Cat. # 3388-100), los cuales se colocaron en un tubo de 2 mL colector y se agregaron 300 µl de H₂O libre de nucleasas y RNAsas. Los tubos colectores se dejaron en agitación constante a 700 rpm y temperatura ambiente, toda la noche.

Posteriormente, el gel junto con el sobrenadante se colocó en un tubo con filtro (IST Engineering, N. Cat. #5388-50), los cuales se centrifugaron a 600 g/ 10 segundos. El volumen total de elución de las genotecas se concentró hasta obtener un volumen de ~25 µl.

7.5 Cuantificación y Evaluación de las genotecas

La cuantificación de las genotecas se llevó a cabo empleando fluorometría utilizando el equipo Qubit y el kit dsDNA HS Assay Kit (invitrogen by Thermo Fisher Scientific No. Cat. # Q32854) siguiendo las instrucciones del fabricante. La solución de trabajo para la evaluación consistió en agregar 1 µl de Qubit reagent y 199 µl de Qubit buffer y mezclar (ambos por muestra). Posteriormente se prepararon los estándares en tubo de 0.5 mL se añadió 190 µl de la solución de trabajo (previamente preparada) y 10 µl del Estándar 1 y en otro tubo de 0.5 mL se colocó 190 µl de la solución de trabajo y 10 µl del Estándar 2. En el caso de las genotecas, en tubo de 0.5 mL se colocó 199 µl de la solución de trabajo y 1 µl de la cada genoteca respectivamente. Se resuspendieron y se incubaron 2 minutos a temperatura ambiente, finalmente se colocaron en el fluorómetro Qubit.

La evaluación del perfil de las genotecas se llevó mediante el análisis electroforético en TapeStation 4200 mediante el uso de el kit High Sensitivity DNA 1000 Reagent Agilent Technologies, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, en una tira de tubos se colocó 2 µl de la muestra de genoteca (un tubo por cada genoteca), y 1 µl de HS RNA Buffer proporcionado por el kit, posteriormente se resuspendió 2000 rpm por 1 min en un IKA vortex. Finalmente se colocó la tira de tubos en el equipo TapeStation 4200.

Establecimiento de la concentración equimolar de las genotecas de RNA pequeños
La concentración en ng/µl de cada genoteca y el perfil de tamaño en pares de bases, se empleó para estimar la concentración equimolar de cada genoteca, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración [nM]} = \frac{\text{Concentración } \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right] \times 10^6}{656.6 \frac{\text{g}}{\text{mol} \times \text{pb}} \times 315 \text{ pb}}$$

Elaboración, Cuantificación y Evaluación del conjunto de genotecas de RNAs pequeños

Posteriormente se llevó a cabo la mezcla de genotecas de manera equimolar, para poder secuenciarlas. Se realizaron dos conjuntos de genotecas equimolares; una correspondiente a las 11 genotecas derivadas de pacientes con MPM y la segunda derivada de las 3 líneas celulares. Cada conjunto de genotecas equimolares se cuantificaron por fluorometría nuevamente, utilizando Qubit y el kit dsDNA HS Assay Kit (invitrogen by Thermo Fisher Scientific No. Cat. #Q32854) y posteriormente se evaluó el perfil de tamaño en pares de bases del conjunto de genotecas equimolar mediante el equipo TapeStation 4200 y el kit High Sensitivity DNA 1000 Reagent Agilent Technologies, con la finalidad de establecer la concentración Molar final de cada una de ellas. Como se mencionó anteriormente, se realizaron dos conjuntos de genotecas equimolares debido a que cada una de ellas se secuenció en plataformas diferentes, la primera se llevó a cabo en el equipo Nextseq 500 y la segunda en el equipo Miseq, ambas plataformas de illumina.

Ambos conjuntos de genotecas equimolares se calcularon para tener inicialmente 4 nM; como se indica en la Tabla 3 y 4 estos cálculos corresponden a las genotecas de muestras de pacientes con MPM secuenciada en el equipo Nextseq 500, en cada tabla se describe la concentración de cada genoteca y el volumen empleado por cada una de las genotecas para obtener la concentración final, se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Volumen } [\mu\text{l}] = \frac{[\text{Volumen final } (\mu\text{l}) \times \text{concentración final } (4\text{nM})] \text{ del conjunto equimolar}}{\text{Concentración inicial de cada genoteca (nM)} \times \text{Número total de genotecas}}$$

Tabla 3. "Cálculos para la concentración equimolar de genotecas derivadas de pacientes con MPM", se indica el volumen empleado de cada muestra derivadas de pacientes con MPM y el volumen agregado de agua para la formación del conjunto de genotecas equimolar.

Conjunto Número	ID Genoteca	ID Muestra	Vf (μl)	Ci (nM)	C(f) nM	Volumen de la genoteca (μl)
1	31	31	100	7.3	4	4.6
2	32	32	100	7.5	4	4.4
3	51	51	100	6.5	4	5.1
4	45	45	100	7.6	4	4.4
5	46	46	100	9.0	4	3.7
6	60	60	100	11.7	4	2.8
7	61	61	100	9.0	4	3.7
8	12	12- 129270-1	100	8.6	4	3.9
9	8	08-7843-3	100	8.2	4	4.1
10	52	52	100	13.8	4	2.4
11	61N	16- 11044D (61N)	100	8.6	4	3.9

12	38V2	120918561 (38V2)	100	8.4	4	4.0
						47.1
Volumen H₂O (μl)						52.9

Una vez elaborado el conjunto equimolar de genotecas es necesario cuantificar su concentración, para ello en la Tabla 4 se muestra el tamaño en pares de bases (pb) de la mezcla de genotecas y la concentración final de la mezcla empleado para la secuenciación.

Tabla 4. "Cuantificación y evaluación del conjunto de genotecas derivadas de pacientes con MPM", se indica la concentración final de la mezcla y el tamaño de este.

Conjunto	[ng/μl]	Tamaño [bp]	
Conjunto final	4nM	pb	nM
Promedio de lectura	0.5695	160	5

Para la formación de la mezcla equimolar de genotecas derivada de líneas celulares, en la tabla 5, se indica la concentración de cada genoteca y el volumen que se empleó para obtener su concentración final de 4nM. Se empleó la misma fórmula que para el primer conjunto equimolar. Una vez elaborado el conjunto equimolar de genotecas se procedió a su cuantificación para obtener su concentración, para ello en la Tabla 6 se muestra el tamaño y la concentración final del conjunto equimolar de genotecas empleado para la secuenciación.

Tabla 5. "Elaboración del conjunto de genotecas derivadas de líneas celulares", se indica el volumen empleado de cada línea celular y el volumen agregado de agua para la formación del conjunto.

Conjunto Número	ID Genoteca	ID Muestra	Vf (µl)	Ci (nM)	Cf (nM)	Volumen empleado (µl)
1	MSTO	MSTO-211H	25	8.3	4	4.0
2	MRC	MRC-5	25	8.7	4	3.8
3	H2452	H2452	25	8.2	4	4.0
						11.9
Volumen H₂O (µl)						13.1

Tabla 6. "Cuantificación y evaluación del conjunto de genotecas para la plataforma MiSeq", se indica la concentración final de la mezcla y el tamaño de este.

Conjunto	[ng/µl]	Tamaño [bp]	
Conjunto final	4nM	pb	nM
Promedio de lectura	0.7415	184	6

Protocolo de Secuenciación de genotecas

La secuenciación de las mezclas equimolares anteriormente descritas se llevó a cabo mediante el diseño de 2 protocolos descritos a continuación, en la tabla 7.

Tabla 7. Descripción de las condiciones empleadas para la realización de la secuenciación masiva.

Plataforma	NextSeq 500	MiSeq
Versión del cartucho	Midoutput v2, lectura forward (single read).	V3, lectura forward (single read).
Número de ciclos	50 ciclos	50 ciclos
Índices	6 nucleótidos	6 nucleótidos
Concentración final	1.25 pM	7.5 pM
Contaminación PhiX	1.5%	5%

Protocolo empleado para secuenciar el conjunto de genotecas equimolar derivada de pacientes con MPM en la plataforma NextSeq

Partimos de una concentración de 5nM de nuestro conjunto equimolar. En un microtubo agregamos 5 µl del conjunto de genotecas equimolar y 5 µl de NaOH 0.2N, se resuspendió y se centrifugó gentilmente, se dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Pasados los 5 minutos se añadió 5 µl de RSB (Buffer de resuspensión) y se resuspendió, posteriormente se agregaron 985 µl de HT1 (Buffer de hibridación para secuenciación). En la secuenciación se empleó un genoma exógeno comercial denominado PhiX, el cual se usa como control interno, se empleó en una concentración 20 pM. Para agregarlo a nuestro conjunto de genotecas equimolar se retiraron 15 µl de nuestro conjunto que ya se encuentra en una concentración de 20 pM y se agregaron 15 µl de PhiX. Posteriormente se tomaron 64.5 µl de conjunto de genotecas ya previamente combinadas con PhiX y se le agregaron 1235.5 µl de HT1. Todo el conjunto equimolar de genotecas quedó a una concentración final de 1.25 pM (1300 µl volumen final); se colocó en el cartucho y se llevó a cabo la secuenciación.

Protocolo empleado para secuenciar el conjunto de genotecas equimolar derivada de las líneas celulares en la plataforma MiSeq

Partimos de una concentración de 6nM de nuestro conjunto de genotecas equimolar derivadas de las muestras de pacientes con MPM. En un microtubo agregamos 5 µl del conjunto equimolar de genotecas y 5 µl de NaOH 0.2N, se resuspendió y se centrifugó gentilmente; se dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Pasados los 5 minutos se añadió 5 µl de RSB (Buffer de resuspensión) y se resuspendió posteriormente; se agregaron 985 µl de HT1 (Buffer de hibridación para secuenciación). En la secuenciación se empleó un genoma exógeno comercial denominado PhiX, el cual se usa como control interno, se empleó en una concentración 20 pM. Para agregarlo a nuestro conjunto equimolar de genotecas se retiraron 30 µl de nuestro conjunto que ya se encuentra en una concentración de 20 pM y se agregaron 30 µl de PhiX. Posteriormente se tomaron 150 µl de conjunto de genotecas ya previamente combinada con PhiX y se le agregaron 450 µl de HT1.

Todo el conjunto equimolar de genotecas quedó a una concentración final de 7.5 pM (600 μ l volumen final); se colocó en el cartucho y se llevó a cabo la secuenciación.

7.6 Evaluación y análisis bioinformático de los datos de secuenciación

Los datos obtenidos de las plataformas de secuenciación fueron evaluados mediante el software FASTAQC, para su posterior análisis bioinformático mediante el software de Strand NGS (<https://www.strand-ngs.com/>).

Para la corrección de los datos se emplearon 2 pruebas estadísticas: la prueba Z y Hochberg FDR. *Prueba Z* es empleada para el análisis y obtención del valor de p en muestras únicas sin réplicas. *Hochberg FDR* es empleada para la corrección de los datos derivados de la prueba de Z.

8. Resultados

8.1 Evaluación de la calidad del RNA total de líneas celulares y muestras derivadas de pacientes con MPM.

Líneas celulares

Para realizar el ensamblaje de las genotecas de RNAs pequeños, se empleó el RNA total de 3 líneas celulares, MRC-5 (control sano), H2452 y MSTO-211H (neoplásicas). Fue necesario determinar su concentración mediante fluorimetría utilizando Qubit 3.0. En la tabla 8 se presenta el rendimiento obtenido de cada RNA respectivo a las líneas celulares.

Como se mencionó en la metodología, lo recomendado por el protocolo para la construcción de las genotecas es 1000 ng (1 μ g) de RNA total, por lo que el rendimiento obtenido es óptimo para la construcción de las mismas.

Tabla 8. Rendimiento total del RNA total de 3 líneas celulares, cuantificación fluororométrica (Qubit 3.0).

Qubit		
Líneas celulares	Rendimiento RNA total (µg)	Volumen total (µl)
H2452	51	50
MSTO-211H	80	50
MRC-5	37.2	50

Una vez evaluada la concentración y el rendimiento del RNA total, se procedió a la evaluación de su integridad, mediante electroforesis automatizada con el kit Agilent RNA 6000 Nano en la plataforma Bioanalyzer, el cual nos proporcionó el número de integridad de RNA, por sus siglas en inglés (RIN). El RIN es un parámetro que va del 1-10, en donde 10 es la mayor calificación correspondiente a una completa integridad, es decir sin ningún grado de degradación; este valor es asignado con base en la proporción de las subunidades del RNA ribosomal (28s y 18s). Un dato adicional que nos proporciona realizar este tipo de ensayo es el valor aproximado de concentración en picogramos (pg). En la figura 8A se muestra la electroforesis; en cada carril se indica el nombre correspondiente a cada muestra. De las tres líneas celulares, se observa la presencia de dos bandas de peso molecular distinto, correspondientes a las subunidades ribosomales del RNA; la primera pertenece a la subunidad 28s de alto peso molecular (se encuentra señalada en un cuadro de color azul), mientras que la segunda a la subunidad 18s que es de menor peso molecular (señalada por un recuadro en color amarillo). En la figura 8B se observan 3 gráficas en donde el eje de las abscisas corresponde al tiempo de corrimiento en segundos (s) y el eje de las ordenadas a la intensidad en unidades de fluorescencia (FU). Así también, se denotan dos picos, correspondientes a las subunidades ribosomales 28S (señalado por una flecha de color azul) y 18S (señalado por una flecha de color amarillo), en donde también se puede observar el RIN asignado a cada una de las muestras con un valor mayor a 9, lo que indica una excelente calidad del RNA de cada una de las muestras para llevar a cabo el protocolo TruSeq Small RNA.

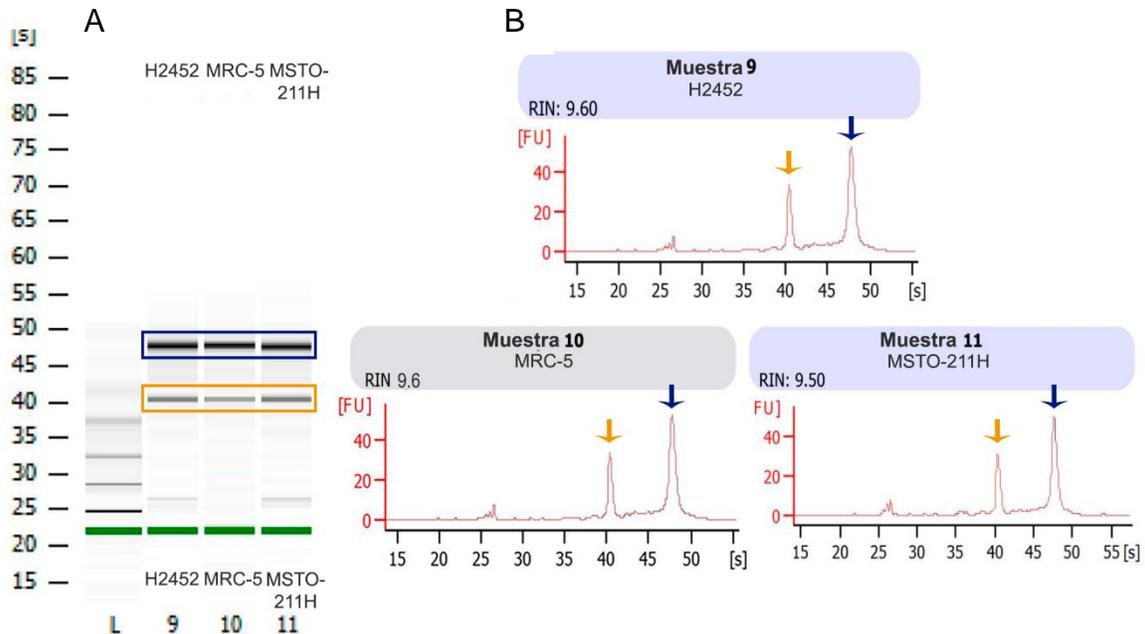
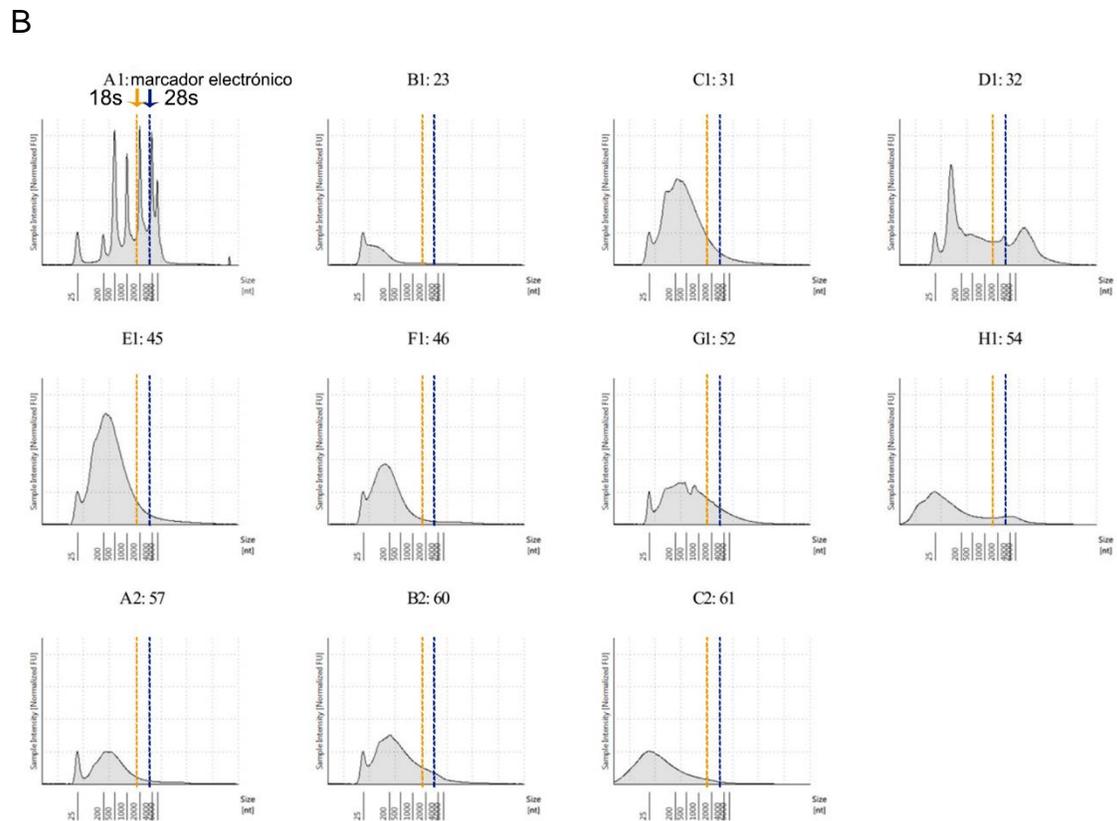
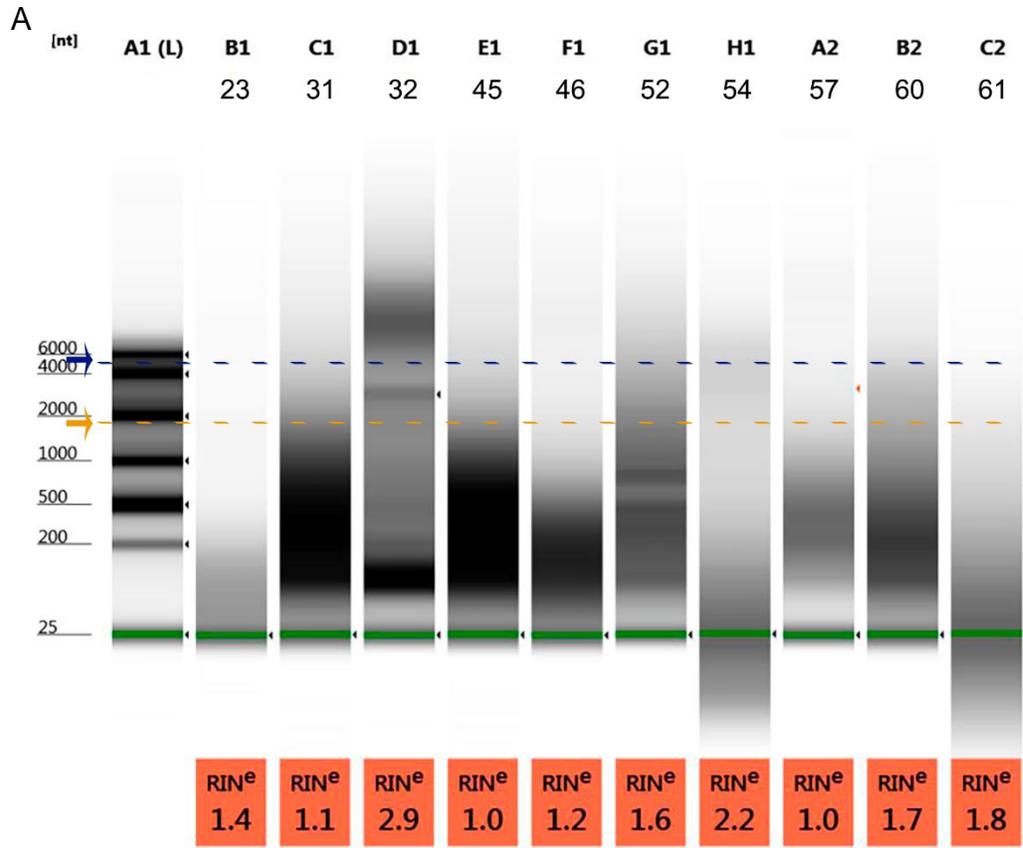


Figura 8. “Evaluación del RNA total de líneas celulares mediante electroforesis automatizada”. A) Electroforesis capilar acoplada B) Perfiles de tamaño en segundos vs unidades relativas de fluorescencia que incluyen el RIN correspondiente.

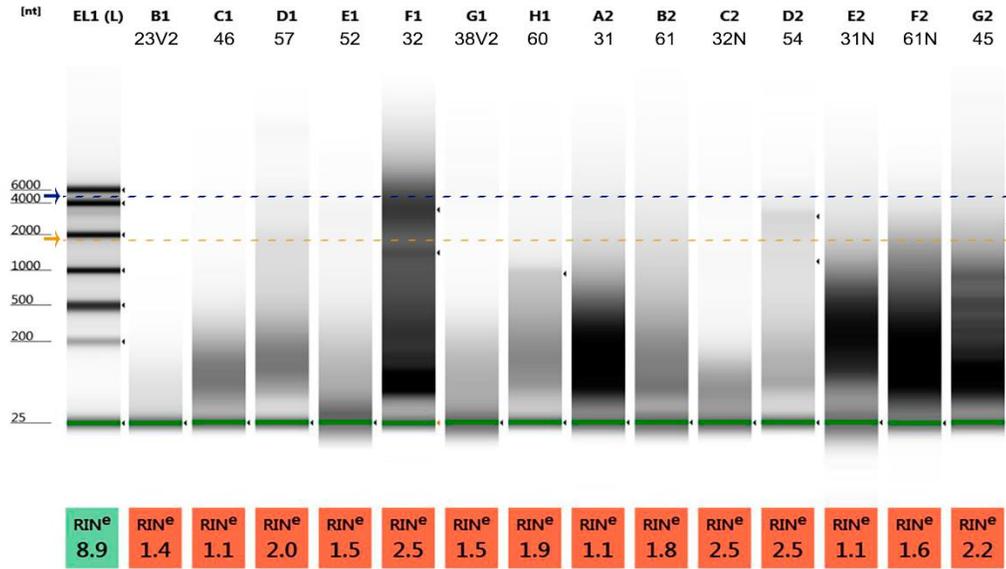
Muestras derivadas de pacientes con MPM

En el caso de las muestras de pacientes diagnosticados con MPM, para realizar el ensamble de las genotecas de RNAs pequeños, el RNA total se extrajo de bloques de parafina, metodología empleada para la preservación de las muestras, sin embargo, por esta misma razón se esperaba una calidad baja de éstas, por lo cual se tomó la estrategia de comenzar con la evaluación de la calidad por electroforesis automatizada mediante el kit High Sensitivity DNA 1000 Reagent, a través del uso de la plataforma TapeStaton 4200 (Agilent Technologies), y posteriormente su cuantificación por Qubit. En la figura 9, se observa la electroforesis capilar acoplada a fluorescencia de las 24 muestras, cada carril corresponde a una muestra de RNA, el marcador de pares de bases utilizado fue electrónico (proporcionado por el equipo), el cual va de 25 pb a 6000 pb. Se presenta en el caso de la figura 9A y 9C una flecha y línea intermitente de color azul, representado en donde debía observarse la subunidad 28S, y de amarillo para el caso de la subunidad 18S. Así mismo podemos percatarnos que todas las muestras presentan un barrido a lo largo

del carril y no es posible determinar las subunidades 28S y 18S. Esto denota un alto grado de degradación, lo cual era lo esperado debido al origen de las muestras. En la parte inferior de la electroforesis, se muestran los valores del RIN, en donde nos podemos percatar que estos valores son muy bajos, siendo indicativo de degradación, adicional a la imagen de la electroforesis. En las figuras 9B y 9D se muestra la representación gráfica de la electroforesis capilar, en donde el eje de las x representa el tamaño en pares de bases (pb) y el eje de las Y la intensidad en unidades de fluorescencia (FU), se esperaba al igual que en las líneas celulares dos picos de diferente tamaño que representan las dos subunidades, pero debido a la degradación de las muestras no fue posible determinarlos ni asignarlos.



C



D

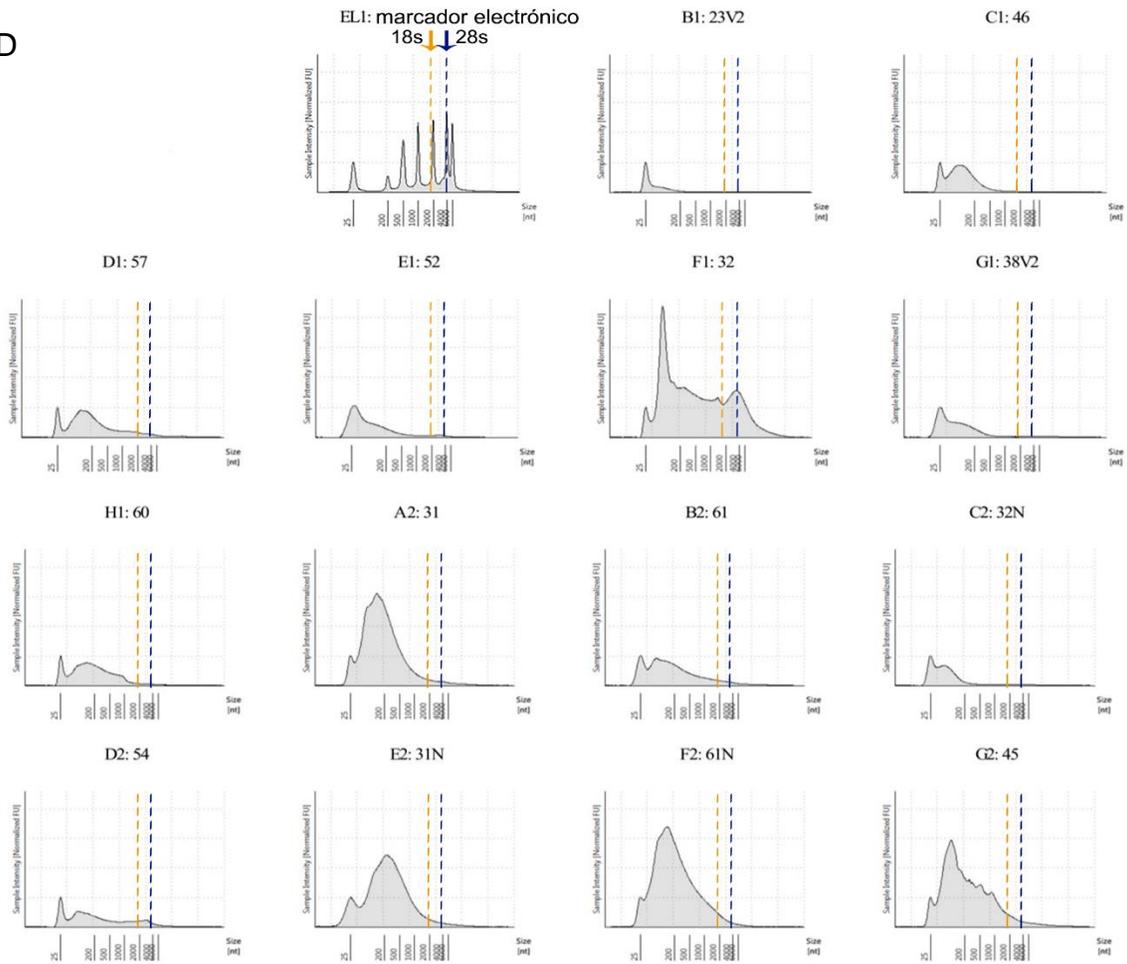


Figura 9. “Evaluación del RNA total de las muestras derivadas de pacientes con MPM mediante electroforesis automatizada”. A y C) Electroforesis capilar acoplada, que incluyen el RIN correspondiente. B y D) Perfiles de tamaño en pares de bases vs unidades relativas de fluorescencia.

Debido al alto grado de degradación y a la baja concentración no fue posible emplear todas las muestras para desarrollar el protocolo TruSeq Small RNA. Las muestras seleccionadas se pueden observar en la tabla 9, como podemos notar no todas las muestras cumplen con la concentración requerida, sin embargo, resultados previos en el laboratorio establecieron una concentración mínima requerida de 0.3 µg, por lo cual se decidió llevar a cabo el ensamble de genotecas de RNA pequeños bajo estas condiciones.

Tabla 9. Rendimiento total de RNA de muestras derivadas de líneas celulares, cuantificación fluorométrica (Qubit), en la columna de muestras de pacientes de MPM.

Muestras de pacientes de MPM	Qubit	
	Rendimiento total (µg)	Volumen total (µl)
31	0.647	12.0
32	1.009	12.9
45	0.800	15
46	0.440	13.5
57	0.234	14.1
60	0.227	14.0
52	0.240	4
61	0.156	10.0
12-12	0.198	13.0
08	0.261	8.9
61N	0.722	8.6
38V	0.062	15

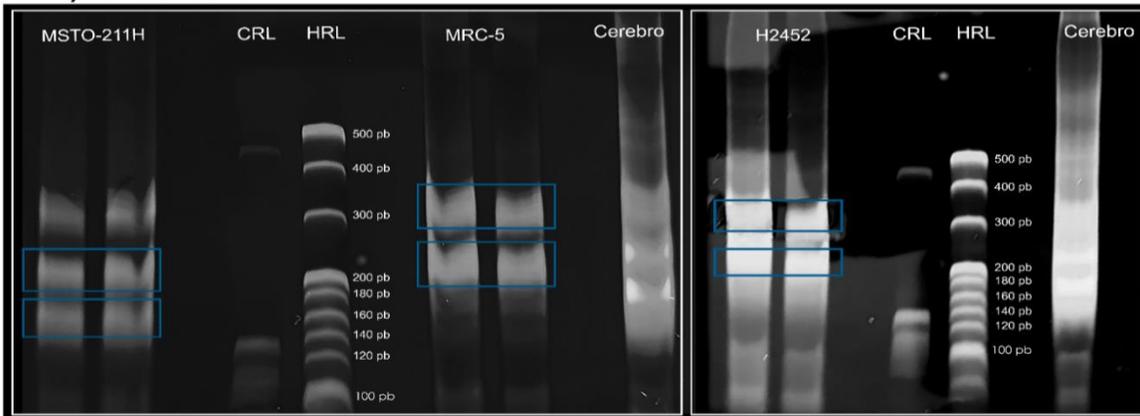
Se emplearon diferentes métodos de evaluación de la integridad para las líneas celulares y para las muestras de MPM, esto se debe a que en su momento se contaba con la disposición del chip de evaluación de la calidad de RNA, sin embargo, ambos métodos nos ofrecen una concentración aproximada y lo más importante la integridad del RNA.

8.2 Determinación y purificación de las genotecas para la aplicación TruSeq Small RNA

Las genotecas de RNA pequeños de las líneas celulares se ensamblaron con 1 µg de RNA total, sin embargo, recordemos que el rendimiento de las 11 muestras derivadas de pacientes con MPM se ensamblaron con un rango 0.4 a 0.5 µg. Una vez ensambladas las genotecas, un paso crítico en el proceso es la purificación correcta de la misma, esta determinación se llevó a cabo mediante una electroforesis en un gel de acrilamida al 6%, con la finalidad de poder visualizar y cotar del gel las genotecas, esto se realizó tanto para las líneas celulares como para las muestras derivadas de pacientes diagnosticados con MPM. Por recomendaciones del protocolo TruSeq Small RNA se llevó a cabo la generación de una genoteca control proveniente de RNA de cerebro, debido a su alto contenido de RNAs pequeños, siendo una indispensable guía en caso de una migración diferente en el gel por parte de las muestras.

En la figura 10, se observan las imágenes representativas de la electroforesis de las genotecas de RNA pequeños obtenidas mediante el protocolo TruSeq Small RNA, en la parte superior del carril se observa el nombre correspondiente a cada línea celular o en su caso a cada muestra de paciente diagnosticado con MPM, en donde se pueden visualizar una serie de bandeos de diferentes pesos moleculares, de éstas se seleccionaron aquellas bandas enmarcadas en los recuadros azules para escindirlas del gel y continuar con su purificación. Se observó que las bandas de las genotecas no migraron de una forma uniforme por esta razón, se decidió cortar las dos bandas que estuvieran más cercanas al peso molecular reportado por la aplicación que es de 140 pb a 160 pb, ya que posteriormente mediante una electroforesis capilar acoplada a fluorescencia se determinó su peso y si este es el adecuado de acuerdo con el protocolo de la aplicación.

A) Líneas celulares



B) Muestras derivadas de pacientes con MPM

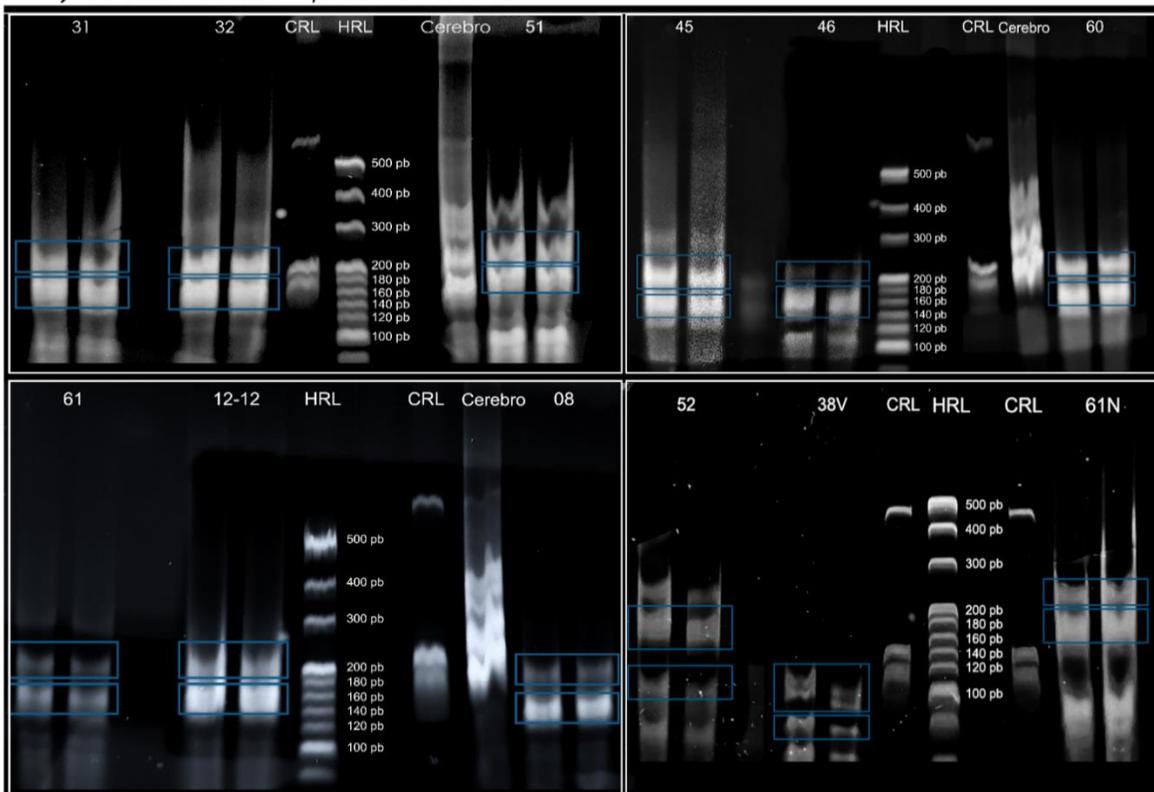


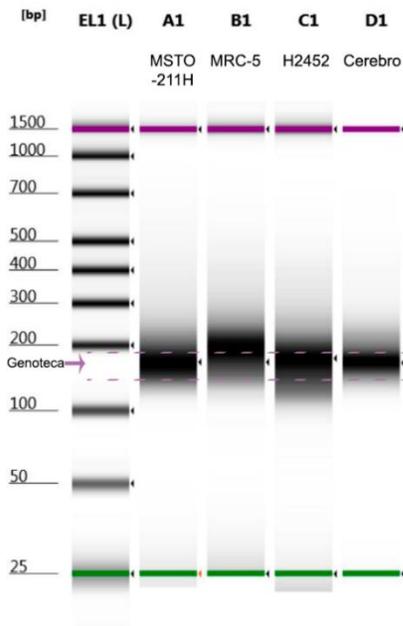
Figura 10. Electroforesis en un gel al 6% de acrilamida, de las genotecas de los snRNA de líneas celulares y las muestras de pacientes con MPM. Se utilizaron los marcadores de peso molecular HRL y CRL. A) El gel corresponde a la electroforesis de líneas celulares MSTO-211H, MRC-5 y H2452. B) El gel corresponde a las muestras derivadas de pacientes con MPM (31, 32, 45, 46, 60, 61, 12-12, 08, 52, 38V y 61N). Se encuentran enmarcadas en un recuadro azul las genotecas seleccionadas para corte y purificación.

8.3 Evaluación cuantitativa y cualitativa de las genotecas para la aplicación TruSeq Small RNA

Una vez obtenidas y purificadas las genotecas tanto de las líneas celulares, como de las muestras de pacientes diagnosticados con MPM, se evaluó el perfil de cada genoteca, lo cual consistió en determinar su concentración y peso molecular, en el equipo TapeStation 4200. Como se mencionó anteriormente se seleccionaron y purificaron 2 bandas, de las cuales inicialmente se realizó la evaluación de las bandas inferiores, ya que por experiencia en el laboratorio son las genotecas que cuentan con el perfil deseado para la secuenciación. En el caso de las líneas celulares, como se observa en la imagen 11A, las bandas observadas corresponden a las genotecas ya que presentaban un tamaño entre los 140 y 160 pb (señalada con una flecha de color morado), este tamaño es el sugerido por el protocolo, adicionalmente en la figura 11B podemos observar en las gráficas el pico de fluorescencia lo que nos indica el valor de concentración para cada genoteca, así como también la distribución de fragmentos que va de 140 a 160 pb, obtenida mediante la longitud de la gráfica, de igual manera señalada de con una flecha de color morado.

En el caso de la evaluación del perfil de las genotecas derivadas de las muestras de pacientes con MPM, se observó que las genotecas tuvieron un tamaño aproximado de entre 140 y 160 pb (figura 12A, y las gráficas mostraron un resultado similar a las genotecas de líneas celulares en donde la distribución de fragmentos esta entre 140 y 160 pb (figura 12B). Tenemos una excepción con la muestra 38V, la cual la banda evaluada en primera instancia inferior o corresponde al peso esperado, sin embargo, se procedió a evaluar la superior, la cual si correspondió con el tamaño esperado de la genoteca (Figura 13).

A



B

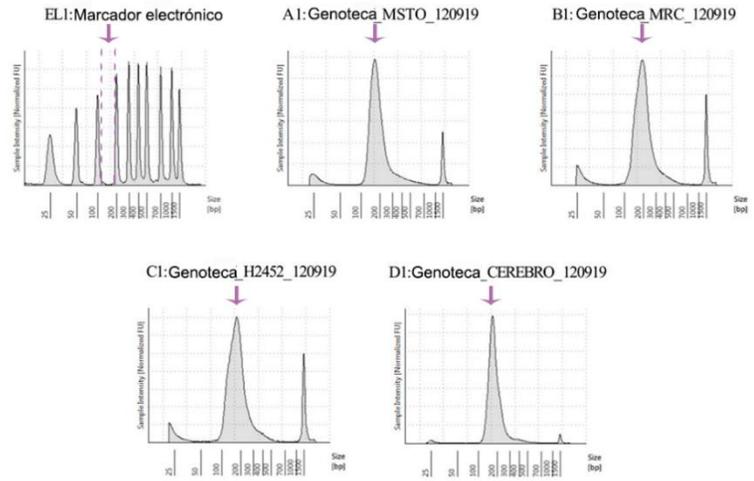
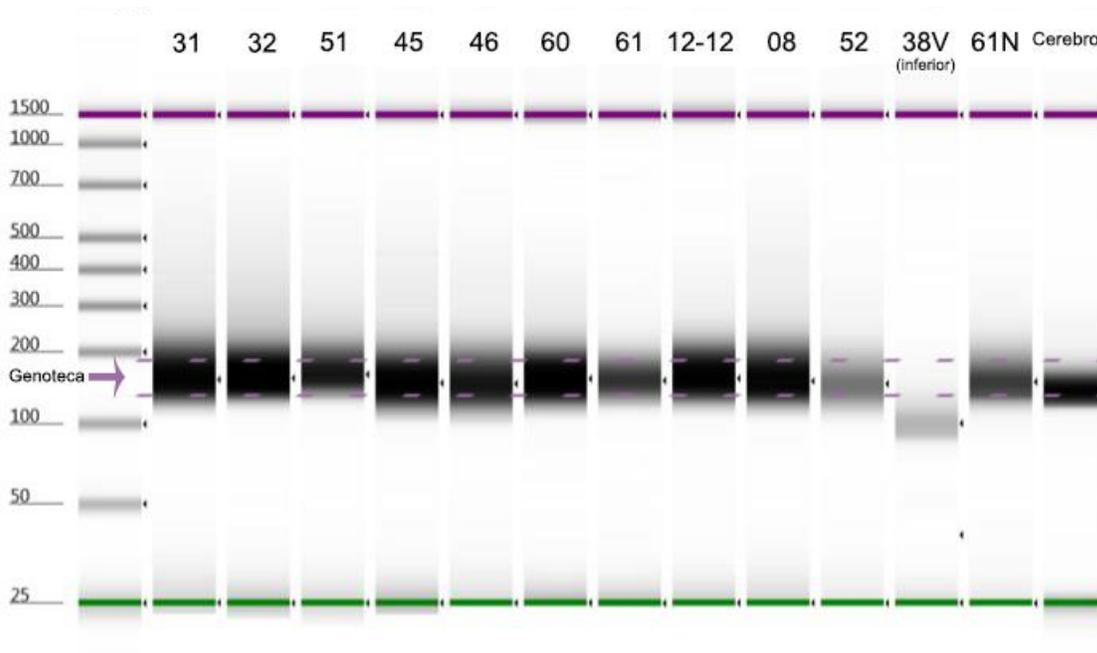


Figura 11. “Evaluación de las genotecas de RNAs pequeños correspondiente a las líneas celulares mediante electroforesis automatizada”. A) Electroforesis capilar acoplada. B) Perfiles de tamaño en pares de bases vs unidades relativas de fluorescencia.

A



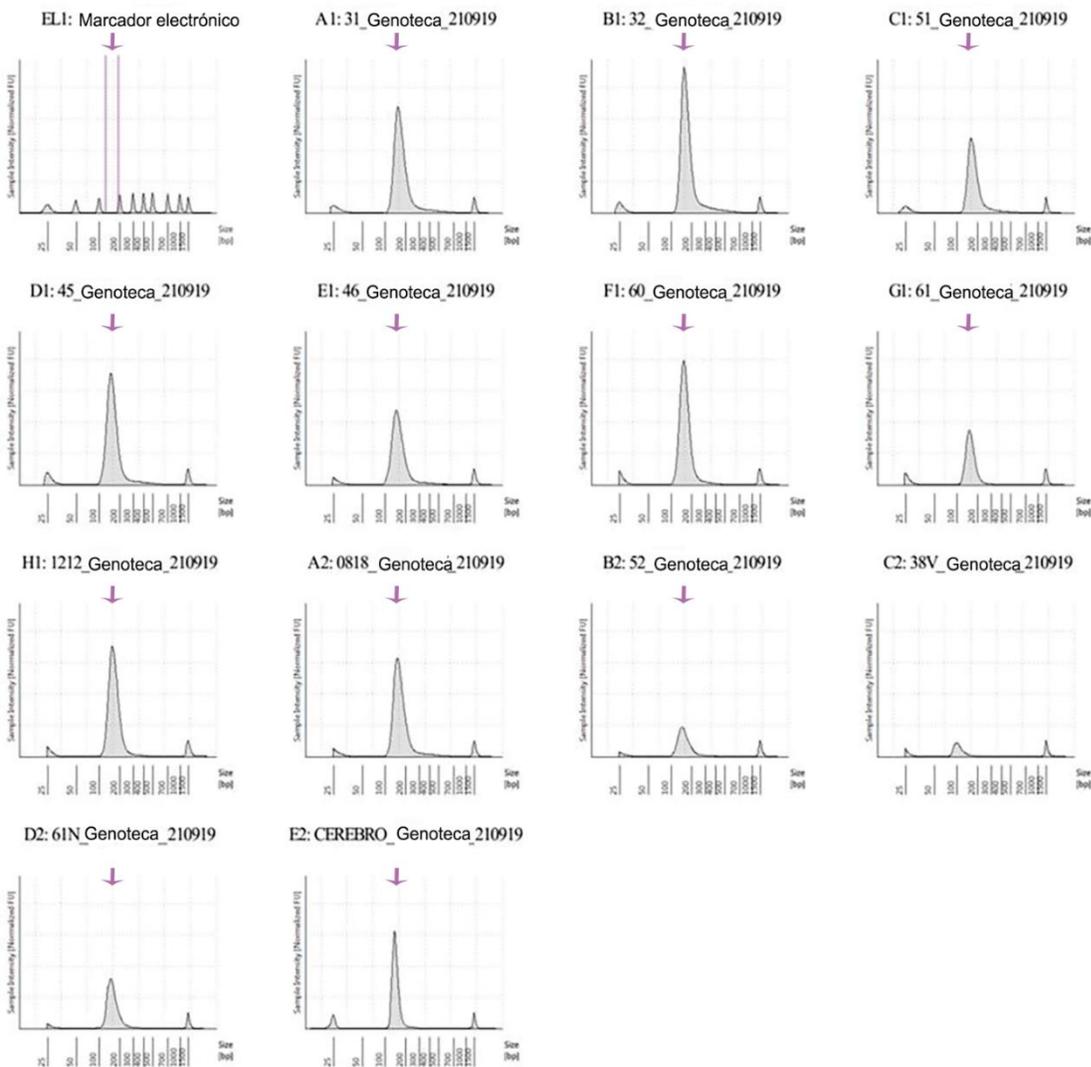
B

Figura 12. “Evaluación de las genotecas de RNAs pequeños correspondiente a las muestras derivadas de pacientes con MPM mediante electroforesis automatizada”. A) Electroforesis capilar acoplada, B) Perfiles de tamaño en pares de bases vs unidades relativas de fluorescencia.

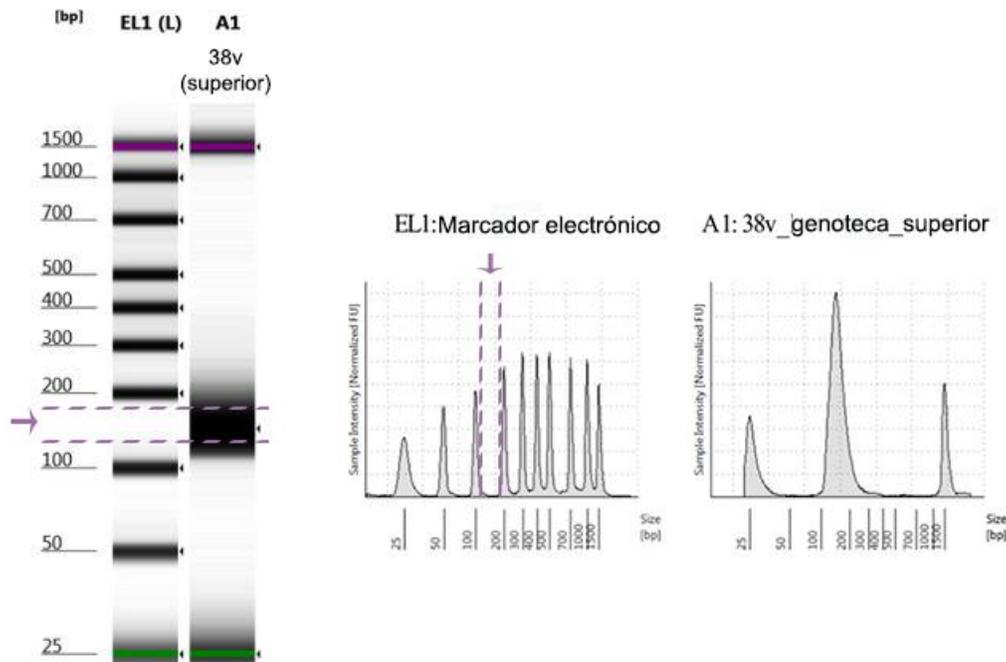


Figura 13. “Evaluación de la genoteca de RNAs pequeños correspondiente a la banda superior de la muestra 38V mediante electroforesis automatizada”. A) Electroforesis capilar acoplada, B) Perfiles de tamaño en pares de bases vs unidades relativas de fluorescencia.

8.4 Identificación de los perfiles de expresión de los RNA pequeños en las muestras derivadas de pacientes con MPM y en las líneas celulares MRC-5, MSTO-211H y H2452.

Con el objetivo de evaluar el perfil de expresión de los RNAs pequeños en las muestras de pacientes diagnosticados con MPM y en las líneas celulares, se realizó un análisis bioinformático con el software Strand NGS. El flujo de trabajo representado en la figura 14, comprende principalmente 4 bloques de análisis que consisten en: 1.- evaluación de la calidad de las secuencias, 2.- alineamiento con el genoma de referencia, 3.- normalización de los datos alineados y 4.- análisis de la expresión diferencial. De manera general el análisis de datos inicia con la generación de los archivos en formato FASTQ, los cuales posteriormente son alineados con un genoma de referencia, en este caso fue el genoma de humano GRCh37/hg19. Después se procede a la normalización de los datos, para finalmente realizar los análisis de perfiles de expresión y perfiles de expresión diferencial.

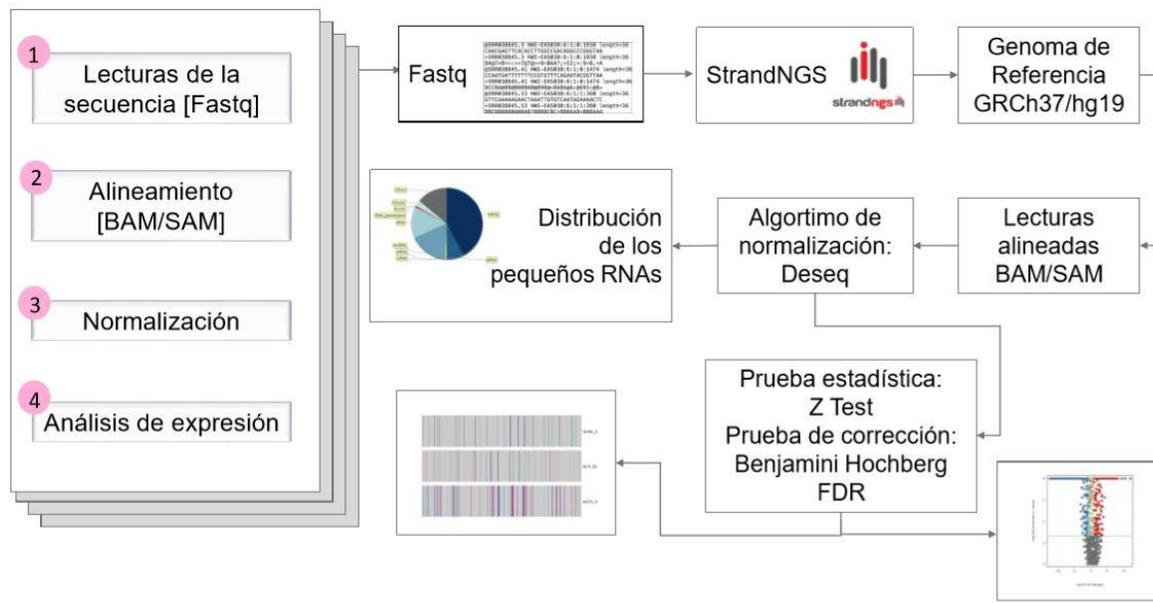


Figura 14. Flujo de trabajo para el análisis bioinformático de los datos generados por secuenciación masiva. En el esquema se resumen los 4 bloques de análisis y los tipos de archivos que se generan.

8.4.1 Evaluación de la calidad de los datos de secuenciación masiva

Los archivos en formato FASTQ contienen la secuencia de nucleótidos de las muestras. Este formato además incluye un valor numérico de la calidad de cada base en la secuencia, el cual indica la confianza de que cada base identificada tiene la calidad necesaria para realizar los análisis siguientes. Una vez obtenidos los archivos con formato FASTQ se evaluaron por el software FASTQC; este es un programa que permite realizar controles de calidad en archivos obtenidos por métodos de secuenciación masiva. Aporta un conjunto de análisis que nos pueden dar un panorama general de los datos, si tienen algún problema antes de proseguir con el análisis o si por el contrario cumplen los estándares de calidad reportados por el sistema. No solo es capaz de indicar la calidad de las secuencias, sino que también es capaz de aportar información sobre parámetros como el contenido de G/C, la calidad de los K-mers (búsqueda de duplicados de secuencia en lecturas cortas y de baja calidad), si hay bases catalogadas como N o si hay secuencias que se encuentren sobre representadas.

Los archivos FASTQ de 3 líneas celulares se analizaron directamente en el software FASTQC. En el caso de los archivos de las muestras de pacientes con MPM, debido a que el número de lecturas y la calidad de los datos obtenidos fue menor a lo esperado debido a que presentaban un alto grado de degradación, se optó por agrupar todos los datos derivados de pacientes con MPM con el fin de lograr un análisis óptimo de estos; esta estrategia ha sido reportada para datos que presentan un bajo rendimiento⁴².

El análisis de calidad se enfoca en analizar que las bases superen la métrica Q30 según la escala de Phred, esta métrica está relacionada logarítmicamente con la probabilidad de error al momento de asignar la base, es decir, cuando una base supere el Q30 indica que la probabilidad de error es de 1 base errónea por 1000 bases incorporadas.

Como se observa en la figura 15 el análisis de calidad arrojó una gráfica representativa debido a que todas las líneas celulares tuvieron el mismo patrón. Esta gráfica corresponde a la línea celular MSTO-211H, en la cual puede observarse que todas las bases obtenidas de las lecturas superan el Q30; en la parte superior se aprecia una línea intermitente roja que indica que la mayoría de las bases cuentan con una excelente calidad y en color azul se muestra la calidad media que tienen todas las bases obtenidas, es decir, su promedio, en el cual también puede observarse que la mayoría alcanzan un valor mayor de 37. Esto indica que las lecturas obtenidas son confiables, ya que la precisión de la base impuesta es del 99.9%, por lo que la calidad obtenida es alta.

La figura 16 corresponde al conjunto de muestras de pacientes con MPM. Se puede apreciar que, a diferencia de la gráfica de líneas celulares, la de calidad que se obtuvo en los datos derivados de líneas celulares es menor; la línea azul representa la media de calidad de cada base y como se puede observar esta oscila entre la métrica Q20 y Q30 con base en la escala de Phred, lo que corresponde a la probabilidad de 1 error en cada 100 bases, equivalente al 99% de asignación correcta de bases, por lo tanto la calidad obtenida es media.

Líneas celulares

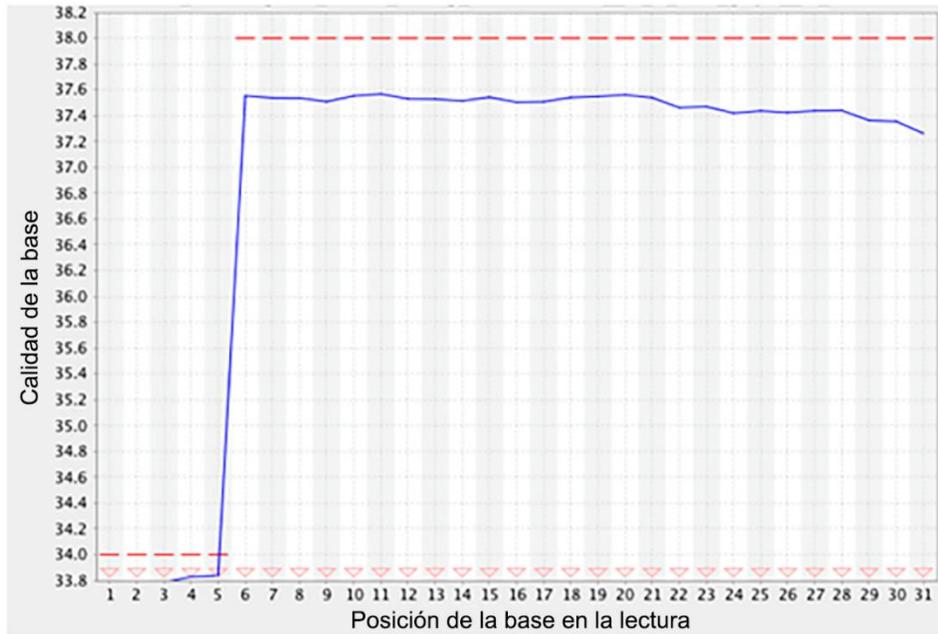


Figura 15. Gráfica de calidad por base de las secuencias obtenidas de la línea celular MSTO-211H, la calidad por base es excelente como se observa en la gráfica supera el Q30.

Conjunto de muestras de MPM

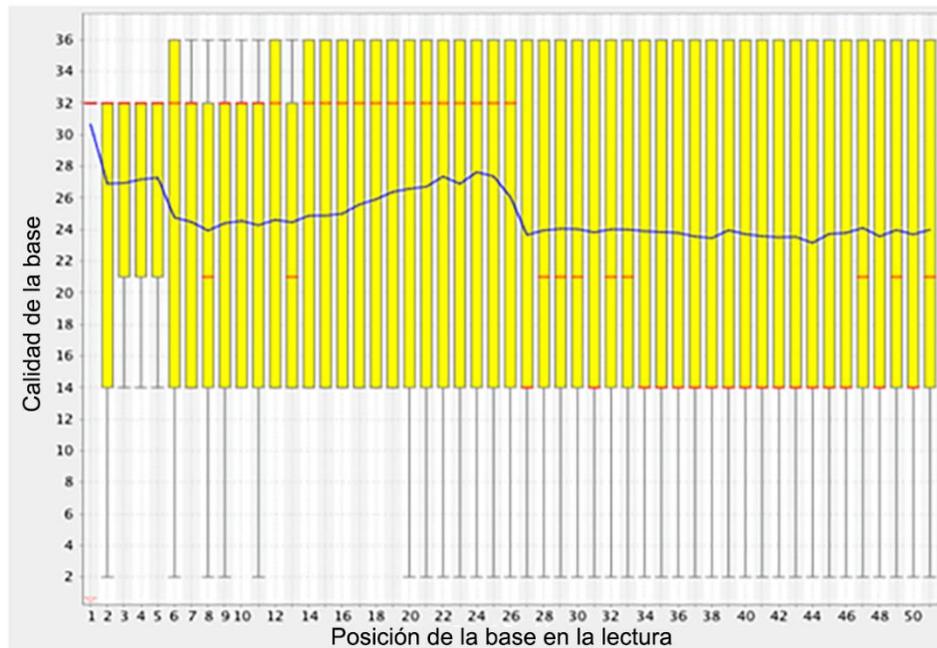


Figura 16. Gráfica de calidad por base de las secuencias obtenidas del conjunto de muestras derivadas de pacientes con MPM, la calidad por base es mala como se observa en la gráfica no supera el Q30.

El archivo en formato FASTQ es el estándar reconocido por las herramientas bioinformáticas para comenzar cualquier análisis, por ello una vez evaluados los archivos con formato FASTQ, se procedió a su análisis mediante el software Strand NGS, el cual es una plataforma que nos permite llevar a cabo el flujo de trabajo de los datos de secuenciación mostrado en la figura 14. Este software nos permite evaluar los niveles de expresión, la detección de nuevos RNA pequeños y la predicción de su clase. Se realizó un alineamiento de las lecturas obtenidas contra el genoma de referencia de humano, que en este caso fue el genoma GRCh37/hg19. Como resultados arrojó dos archivos en formato BAM y SAM, los cuales muestran la posición de las bases sobre el genoma de referencia contra el cual fue mapeado.

Los archivos en formato BAM y SAM son necesarios para llevar a cabo la normalización de los datos con la herramienta DeSeq. Esta herramienta nos permite el ensamblaje de los sncRNAs mediante la selección de las lecturas alineadas con el genoma de referencia y con esto poder determinar la abundancia de las diferentes clases de sncRNAs (miRNAs, snoRNAs y piRNAs), tanto de las líneas celulares como del conjunto de muestras derivadas de pacientes con MPM.

Mediante la normalización del número de lecturas se obtuvo el porcentaje de expresión de las diferentes clases de sncRNAs de cada muestra. En la figura 17A que corresponde a la línea celular MRC-5, se puede apreciar que la clase de sncRNAs más abundante son los micro RNA, con un porcentaje de expresión de 56.27%, siendo los más representativos: hsa-mir-143 y hsa-mir-241, seguido de la clase snoRNA con un 23.72%, de los cuales los más representativos son: SNORD114-14 y SNORD113-7, y con un menor porcentaje de expresión la clase de los piRNA con un 2.32% siendo el más representativo el piR-31636. En la figura 17B, la cual corresponde a la línea celular MSTO-211H, se puede observar que de igual manera, la clase de sncRNAs más representativa son los micro RNA, con un porcentaje de expresión de 51.51%, los más representativos fueron: hsa-mir-4516 y hsa-mir-204, seguido de la clase snoRNA con un 21.25%, de los cuales los más representativos son: SNORD114-23 y SNORD114-4, y con un menor porcentaje de

expresión la clase de los piRNA con un 9.46% siendo el más representativo el piR-45897. En la figura 17C podemos percatarnos que de igual manera, se presentó el mismo patrón, en donde la clase de sncRNAs más representativa son los microRNA, con un porcentaje de expresión del 44.59%, los más representativos fueron: hsa-mir-139 y hsa-mir-95, seguido de la clase snoRNA con un 32.03%, de los cuales los más representativos son: SNORD116-18 y SNORD40, y con un menor porcentaje de expresión la clase de los piRNA con un 4.38% siendo el más representativo el piR-45897.

Para el caso de la muestras derivadas de pacientes con MPM, se puede observar en la figura 17D el mismo patrón de distribución de los sncRNAs que en las líneas celulares, en donde el mayor porcentaje de expresión está dada por la clase de los microRNAs con el 48.35%, de los cuales los más representativos son: hsa-mir-1234 y hsa-mir-1302, seguido de los snoRNA con un 4.15%, siendo el más representativo snoU13, y de igual manera, la clase que obtuvo un menor porcentaje fueron los piRNA con un 2.25% del cual los más representativos fueron piR-59592 y piR-42430.

El análisis identificó la presencia de otros sncRNAs, como pequeños RNAs nucleares por sus siglas en inglés snRNA (*small nucleolar RNA*) y otra subclase perteneciente a la clase de los snoRNAs, por sus siglas en inglés scaRNAs. Finalmente, también fueron hallados fragmentos de RNAs de transferencia, por sus siglas en inglés tRNAs. Como parte del análisis se pudieron identificar lecturas de intrones y exones; es normal identificar este tipo de lecturas cuando se realiza la secuenciación de sncRNA, ya que la aplicación parte de RNA total, así mismo es posible observar que el porcentaje de lecturas obtenido es bajo en comparación con las lecturas asociadas a los sncRNAs.

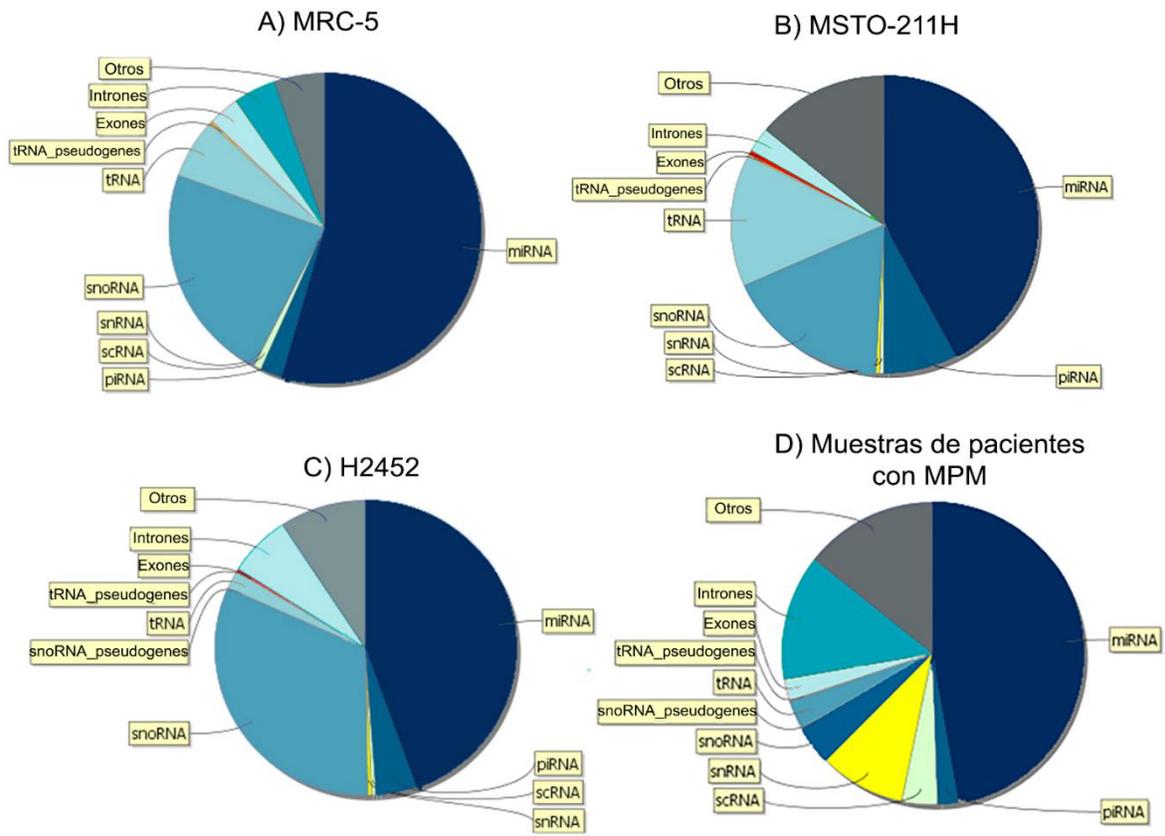


Figura 17. Distribución de las diferentes clases de sncRNAs. A) Línea celular MRC-5. B) Línea celular MSTO-211H. C) Línea celular H2452. D) Conjunto derivado de las muestras de pacientes con MPM.

Tabla 10. Porcentaje de expresión de cada clase de sncRNAs en cada muestra analizada por Strand NGS.

Muestra	microRNAs	snoRNAs	piRNAs	Otros
MRC-5	56.27%	23.72%	2.32%	17.69%
MSTO-211H	51.51%	21.25%	9.46%	17.78%
H2452	44.59%	32.03%	4.38%	19%
Muestras de MPM	48.35%	4.15%	2.25%	45.25%

8.5 Análisis de expresión diferencial

El principal objetivo del análisis de expresión diferencial es cuantificar el nivel de expresión de los sncRNAs entre las diferentes muestras al compararlas con una muestra control; por lo tanto, se establecieron tres grupos a comparar: el grupo 1 corresponde a la comparación de la línea celular MRC-5 contra H2452, el grupo 2 corresponde a MRC-5 contra MSTO-211H y finalmente el grupo 3 corresponde a MRC-5 contra el conjunto de muestras de pacientes con MPM. Para realizar este análisis se empleó la prueba estadística Z, la cual nos permite obtener el valor de p , siendo los valores significativos cuando su valor sea <0.05 . Con el fin de evitar falsos positivos de la prueba estadística Z, se requiere de una corrección, para ello se empleó la herramienta estadística tasa de falsos descubrimientos, por sus siglas en inglés FDR (desarrollada por Benjamini y Hochberg).

Del análisis de expresión diferencial se obtuvieron dos tipos de gráficas: un mapa de calor y un diagrama de volcán. El mapa de calor es una representación gráfica que indica la expresión que tienen los sncRNAs en cada grupo; está conformado por líneas de colores, cada línea representa un sncRNAs y su color el nivel de su expresión, en donde los colores cálidos representan una sobre regulación, mientras que colores fríos representan una sub expresión. Así mismo, debajo de cada capa de calor hay un código de barras que hace referencia a un sncRNA específico. El diagrama de volcán es una representación de la dispersión que relaciona la significancia estadística (valor de p) contra la tasa de cambio. Este diagrama permite hacer una identificación visual e individual de los sncRNAs que presentan un grado de expresión con valor de $p < 0.05$, es decir aquellos sncRNAs que presentan una expresión estadísticamente significativa. Cada sncRNA está representado por un cuadrado, de la misma manera, aquellos que presentan un color cálido (rojo) representa una sobre expresión, mientras aquellos con un color frío (azul) una sub expresión. A partir de este análisis se obtuvieron los 12 sncRNAs que mostraron una mayor significancia estadística en el nivel de su expresión.

Como se observa en la figura 18A, hay diferencia en los niveles de expresión de los sncRNAs entre la línea celular MRC-5 y H2452. Se puede apreciar un grupo de sncRNAs que están diferencialmente expresados; en la línea celular MRC-5 se encuentra sobre regulado y en la línea H2452 sub regulado. Con los sncRNAs que presentan una diferencia estadísticamente significativa se realizó un diagrama de volcán (figura 18B), en donde se observa una mayor cantidad de sncRNAs sub regulados respecto a los sobre expresados en la muestra H2452. Estos fueron los 12 sncRNAs que presentaron una diferencia estadísticamente significativa con un valor de $p < 0.05$: hsa-mir-82, hsa-mir-183, hsa-mir-139, hsa-mir-95, SNORD116-18, hsa-mir-3934, RNU5F-1, hsa-mir-196b, hsa-mir-378c, hsa-mir-378a, hsa-mir-449c y RNU4.

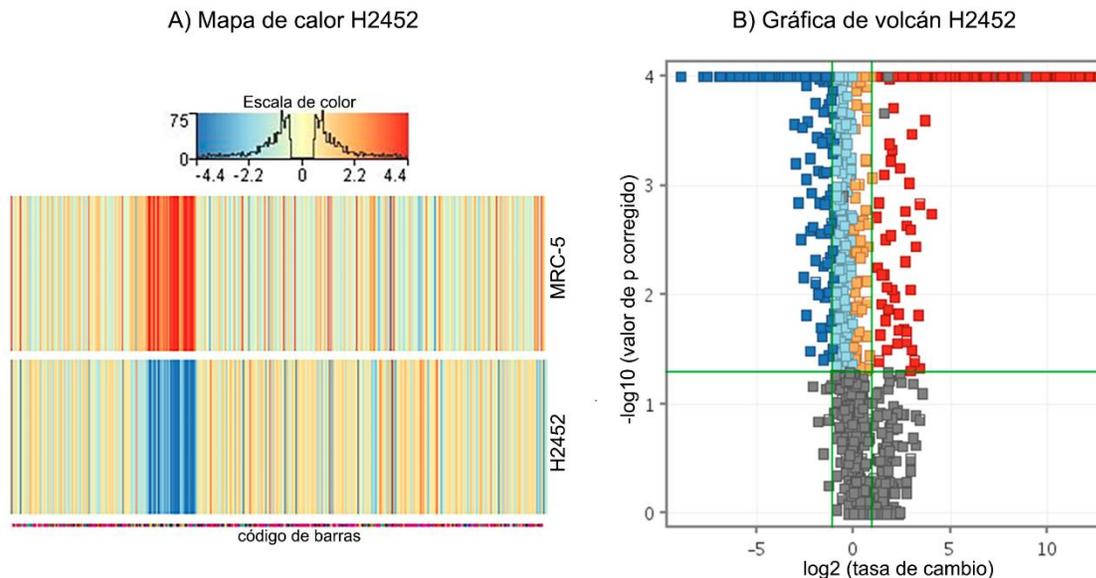


Figura 18. Diagramas obtenidos a partir del perfil de expresión diferencial a partir del grupo 1. Los tonos rojos representan una regulación positiva de los sncRNAs, mientras que los azules una regulación negativa. A) Mapa de calor entre la línea celular MRC-5 (sano) vs H2452 (neoplásico). B) Diagrama de volcán, el eje de las abscisas nos indica la tasa de cambio y el eje de las ordenadas el $-\log$ del valor corregido de p .

En la figura 19A se representa el diagrama correspondiente al análisis entre la línea celular MRC-5 y MSTO-211H. Se puede observar que de igual manera hay una diferencia en los niveles de expresión de los sncRNAs, sin embargo, en este grupo el comportamiento es completamente diferente. Los sncRNAs que están diferencialmente expresados, en la línea celular MRC-5 se encuentran sub

regulados y en la línea MSTO-211H sobre regulados. Con los sncRNAs que presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) se realizó el diagrama de volcán (figura 19B), en donde se observa la presencia de más sncRNAs sobre regulados, respecto a los sub regulados en la muestra MSTO-211H. Estos fueron los 12 sncRNAs que presentaron una diferencia estadísticamente significativa: hsa-mir-143, hsa-mir-490, hsa-mir-214, hsa-mir-145, hsa-mir-34c, hsa-mir-549a, hsa-mir-214-3p, hsa-mir-199b-5p, hsa-mir-490-5p, hsa-mir-708, SNORA77 y SNORD114-12.

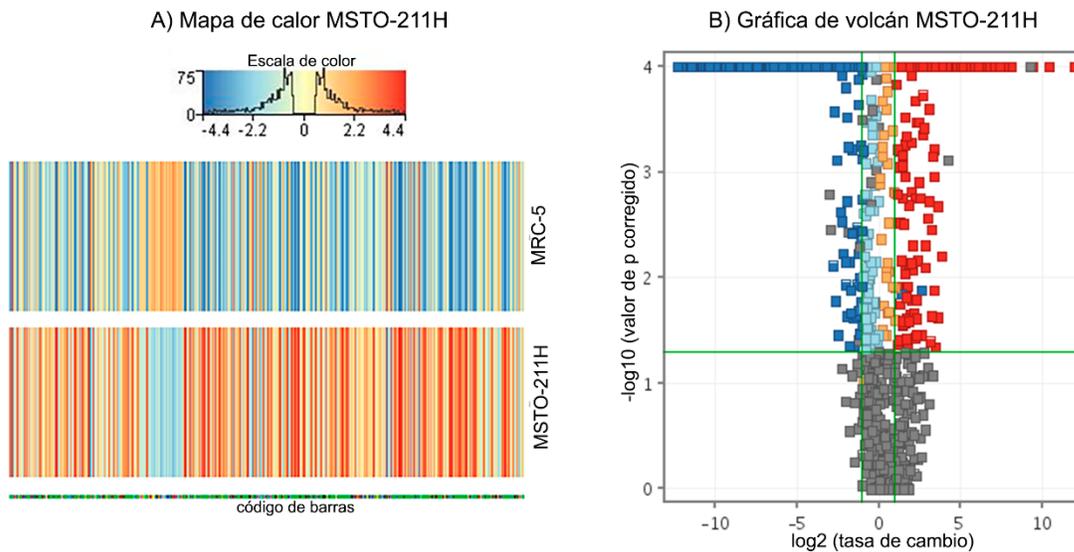


Figura 18. Diagramas obtenidos a partir del perfil de expresión diferencial a partir del grupo 2. Los tonos rojos representan una regulación positiva de los sncRNAs, mientras que los azules una regulación negativa. A) Mapa de calor entre la línea celular MRC-5 (sano) vs MSTO-211H (neoplásico). B) Diagrama de volcán, el eje de las abscisas nos indica la tasa de cambio y el eje de las ordenadas el $-\log$ del valor corregido de p .

Finalmente, en la figura 19A se presenta la gráfica obtenida a partir del análisis de expresión diferencial entre MRC-5 y las muestras derivadas de pacientes con MPM. Se aprecia que el comportamiento de este grupo es muy parecido al del grupo 1 (MRC-5 / H2452), en donde es notoria la presencia de varios sncRNAs con pérdida en su regulación negativa, es decir predominando una sub expresión. En la figura 20B mediante el diagrama de volcán podemos observar que pocos son los sncRNAs que presentan cambios estadísticamente significativos ($p < 0.05$). Se identificaron los

12 sncRNAs con mayor pérdida en su regulación y se encuentran hsa-let-7a-2, hsa-mir-181a-1, hsa-mir-127, SNORD43, hsa-mir-127, SNOD43, hsa-mir-21, SNORD104, hsa-mir-222, pir-322678, hsa-mir-143, hsa-mir-92a-1, SNORD48 y SNORD42.

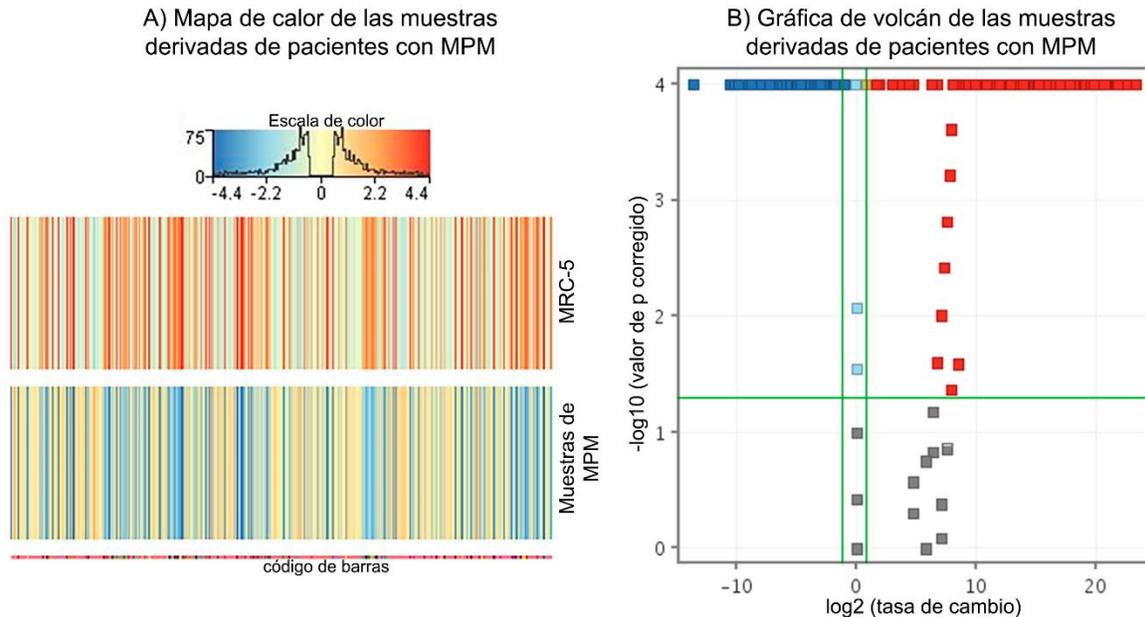


Figura 19. Diagramas obtenidos a partir del perfil de expresión diferencial a partir del grupo 2. Los tonos rojos representan una regulación positiva de los sncRNAs, mientras que los azules una regulación negativa. A) Mapa de calor entre la línea celular MRC-5 (sano) vs las muestras de pacientes con MPM (neoplásico). B) Diagrama de volcán, el eje de X nos indica la tasa de cambio y el eje de Y el -log del valor corregido de p.

Como ya se ha mencionado, a partir del análisis de expresión diferencial se obtuvieron los RNAs pequeños que mostraron una mayor pérdida en su regulación tanto negativa como positiva de cada grupo. En la figura 20A podemos observar los 24 sncRNAs correspondientes al grupo 1 (MRC-5 vs H2452) y en la figura 20B al grupo 2 (MRC-5 vs MSTO-211H), identificando sus respectivos 12 sobre regulados y 12 sub regulados. Para el caso del conjunto derivado de muestras de pacientes con MPM solo se pudieron obtener los 12 sncRNAs sobre regulados (figura 20).

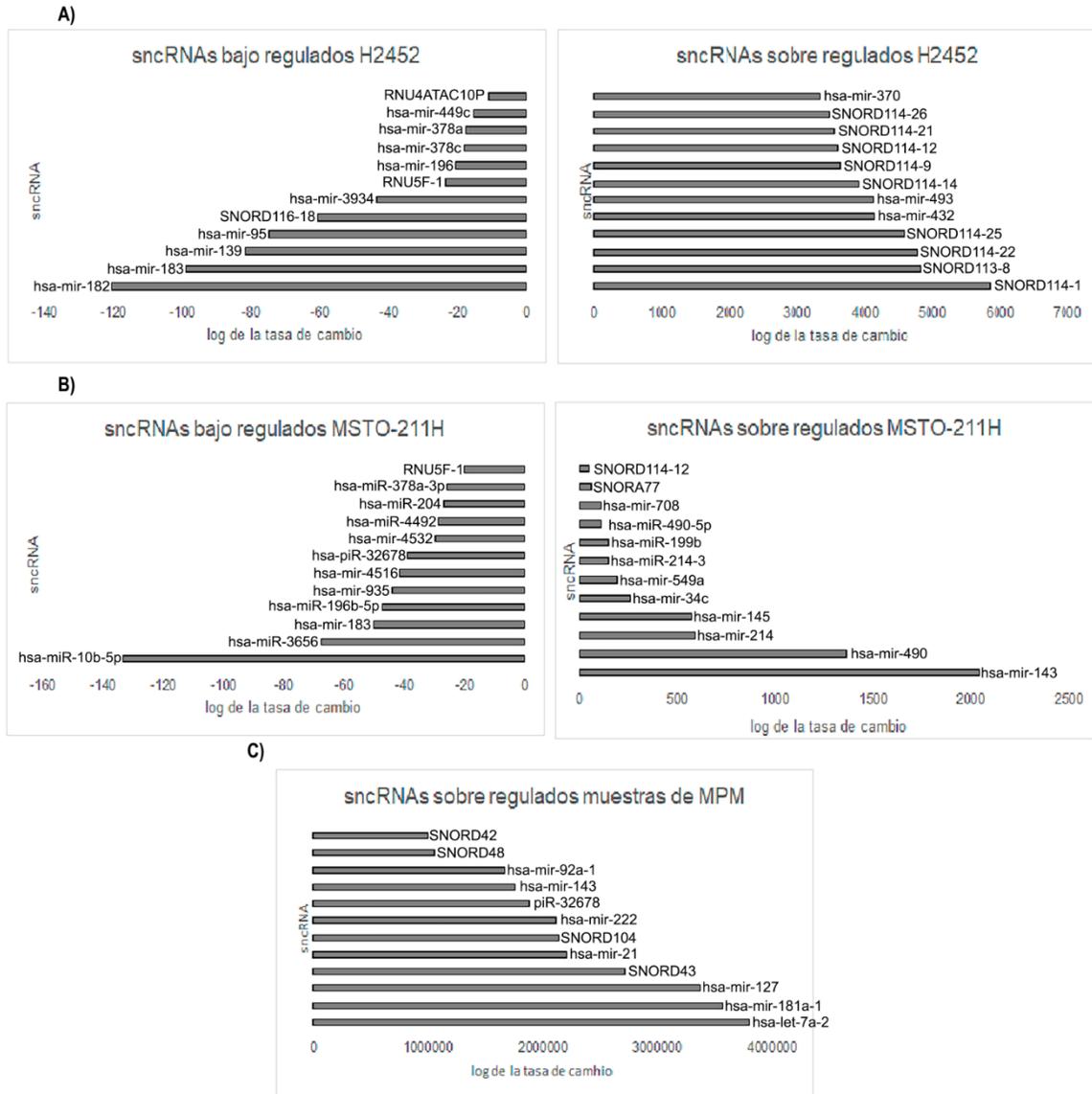


Figura 20. Análisis de expresión diferencial de sncRNAs por cada grupo, se muestran los 12 sncRNA con una mayor regulación positiva y los 12 sncRNA con una menor regulación negativa, de cada muestra. A) Grupo 1. MRC-5 / H2452. B) Grupo 2. MRC-5 / MSTO-211H. C) Grupo 3. MRC-5 / Muestras derivadas de pacientes con MPM.

9. Discusión de Resultados

La tecnología de secuenciación masiva ha sido una gran revolución en la investigación en diferentes campos, como en biología molecular o en el diagnóstico clínico. Esto ha permitido la identificación de biomarcadores con potencial para mejoras en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento clínico de diversas patologías. Es por esto que la búsqueda de nuevos biomarcadores representa un nuevo reto para poder abordar la problemática que presentan diversas enfermedades como el MPM en donde la detección y tratamientos son aún poco favorables para el paciente. Existe una gran diversidad de biomarcadores propuestos, dentro de los cuales un grupo que ha tomado gran relevancia por su implicación en diversas patologías como en el cáncer son los sncRNAs. En este trabajo se estudió el perfil de expresión de los RNAs pequeños debido a la importancia de estas moléculas y a la poca información que existe de su papel en el MPM. Este es el primer trabajo que aborda el perfil de expresión de las diferentes clases de sncRNAs en MPM.

Se realizó el análisis de los datos generados por secuenciación masiva, se hicieron 3 grupos para facilitar la interpretación de los datos, el grupo 1 corresponde a la comparación entre la línea celular MRC-5 (control sano) contra la línea celular H2452 (Mesotelioma de epitelio pulmonar), el grupo 2 corresponde a la línea celular MRC-5 contra la línea celular MSTO-211H (Mesotelioma bifásico) y finalmente el grupo 3 corresponde a la línea celular MRC-5 contra el conjunto de muestras de pacientes con MPM. Para cada grupo se seleccionaron los 12 sncRNAs que presentaron una pérdida en su regulación tanto positiva como negativa. De los 12 sncRNAs por grupo nos enfocamos en aquellos RNAs pequeños que se compartieran entre líneas celulares y muestras de pacientes con Mesotelioma Pleural Maligno, los cuales incluyen como sub expresados a: hsa-mir-196b, hsa-mir-378a, RNU5F-1, hsa-mir-182, hsa-miR-10b-5p, hsa-mir-183 y sobre regulados a: SNORD114-12, hsa-mir-432, hsa-mir-143, hsa-pir-32678 y hsa-let-7a-2. Decidimos enfocarnos en aquellos RNAs pequeños que se comparten entre las líneas celulares y las muestras de pacientes con Mesotelioma Pleural Maligno debido a que la pérdida en su regulación en las diferentes muestras podría indicarnos su importancia en el desarrollo de MPM, ya que diferentes grupos de

investigación han descrito su relevancia en diversos tipos de cáncer, como se describirá a continuación.

Es importante mencionar que la expresión de los sncRNA es tejido específico, así como también pueden presentar características de oncogén o gen supresor de tumor, dependiendo del tipo de cáncer.

El micro RNA hsa-mir-196b se encontró sub regulado en las líneas celulares MSTO-211H y H2452. Se ha reportado que tiene un papel dual dependiendo del tipo de cáncer, ya que puede actuar como oncogén o gen supresor de tumor. Bhatia et. al, encontró que este miRNA presenta una baja expresión en células de linfocitos B de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA), una característica de estas células es que presentan una elevada expresión del gen *c-myc*, el cual es blanco de hsa-mir-196b, por lo que al aumentar la expresión del miRNA, se observó que disminuye la expresión de su blanco *c-myc* y este a su vez disminuye los niveles de expresión de los oncogenes: *Bcl-2*, *hTERT* y *AATF* los cuales son regulados por *c-myc*, por lo cual proponen a hsa-mir-196b como un biomarcador terapéutico para el tratamiento de LLA de células B, es por ello que se podría estudiar la expresión de este gen y evaluar su papel en el desarrollo de MPM. Ren et. al, reportó que la sobre regulación de hsa-mir-196b en cáncer colorrectal está relacionada con el desarrollo neoplásico temprano, por lo que podría presentar características de oncogén. Por lo tanto, evaluaron el efecto del silenciamiento de este micro RNA sobre la quimioresistencia en líneas celulares y observaron que al disminuir la expresión del miRNA hubo un incremento en la tasa de apoptosis cuando fueron tratadas con Fluorouracilo (5-FU). Debido a los resultados observados propusieron a hsa-mir-196b como un probable biomarcador en la resistencia a la quimioterapia. Además, se ha reportado que este miRNA también puede actuar como oncogén en cáncer de mama y pancreático^{43,44,45}.

El micro RNA hsa-mir-378a se encontró sub regulado en la línea celular MSTO-211H y H2452. Este miRNA se ha reportado sub regulado en diferentes tipos de cáncer como gástrico, oral y colorrectal. Zhang et al, realizaron un perfil de expresión de 4 líneas celulares de cáncer colorrectal, reportando bajos niveles de expresión de este miRNA en todas las líneas celulares. Debido a esto evaluó el

crecimiento tumoral *in vivo*; realizó xenotransplantes en ratones con el fin de restablecer la función del miRNA. El grupo reportó que los ratones inyectados con células que presentan una sobre regulación de hsa-mir-378a desarrollaron tumores significativamente más pequeños, por lo cual asociaron que la sobre expresión del miRNA tiene un efecto en el crecimiento y proliferación tumoral, es por ello que propusieron a hsa-mir-378a como un probable biomarcador de pronóstico y terapia en cáncer colorrectal. Así mismo, se ha observado que hsa-mir-378a también puede actuar como un oncogén en otros tipos de cáncer como el pulmonar y en leucemia mieloide crónica (LMC). Jichun Ma et. al emplearon líneas celulares leucémicas transfectadas con el hsa-mir-378a con el fin de incrementar la expresión del miRNA. Ellos encontraron que la sobre regulación de este miRNA induce la tolerancia a la quimioterapia con 5-FU e inhibe la apoptosis, proponiéndolo como un probable blanco terapéutico. Es por esto que la importancia de estudiar este micro RNA en MPM resulta relevante, ya que podría tener un impacto en diferentes procesos implicados en el desarrollo tumoral y así ayudar a entender mejor la etiología de la enfermedad^{46,47,48}.

RNU5F-1 se encontró sub expresado en las líneas celulares MSTO-211H y H2452. Es un sncRNA de la clase nuclear que se ha encontrado presente en la línea celular HELA y se ha descrito su estructura, sin embargo, aún no hay reportes de este sncRNA en alguna vía de señalización, en cáncer o en alguna otra patología, por lo que validar su presencia o su función en MPM resulta importante ya que no hay reportes que lo relacionen con la enfermedad⁴⁹.

El miRNA hsa-mir-182 fue el sncRNA que presentó los niveles más bajos de expresión en la línea celular H2452 (figura 21), este miRNA es miembro de la familia miR-183 (conformada por el miR-96, miR-182 y miR-183) la cual se ha reportado que presenta altos niveles de expresión en diversos tipos de cáncer. Xin Xu et. al encontraron que hsa-mir-182 presentaba bajos niveles de expresión en cáncer colorrectal, por lo que ellos evaluaron en modelos *in vitro* e *in vivo* su sobre regulación y observaron que es capaz de inhibir la proliferación celular y la tumorigénesis, proponiendo a este micro RNA como un biomarcador terapéutico. Otro grupo de investigación que encontró a este miRNA sub regulado fue el de

Yihua Sun et. al; ellos reportaron que en cáncer de pulmón el miRNA hsa-mir-182 presentaba una baja expresión que puede estar relacionada con el aumento en la expresión del oncogén RGS17, ya que posee un sitio de unión para este miRNA. Debido a esto incrementaron la expresión de este micro RNA y evaluaron el efecto que tiene en la regulación del gen RGS17. Se observó que esta restauración en la función del miRNA disminuye la expresión del gen RGS17 y tuvo como consecuencia la inhibición de la proliferación celular y el potencial de crecimiento. Nuestros resultados coinciden con los trabajos citados anteriormente, por lo que el miRNA hsa-mir-182 podría estar implicado de la misma manera en el MPM, sin embargo, es necesaria su validación, ya que con base en la literatura este miRNA podría fungir como un probable biomarcador terapéutico proporcionando información de la progresión tumoral en el MPM^{50,51,52}.

En la línea celular MSTO-211H se identificó a hsa-miR-10b-5p sub expresado. Jianyang Qin et, al reporta también una baja expresión de este miRNA en células de cáncer colorrectal. Debido a esto, el grupo de investigación realizó un ensayo para restaurar la función del miRNA hsa-miR-10b-5p. Ellos observaron que el incremento en la expresión de este micro RNA inhibe los procesos de proliferación, migración e invasión, así también se le atribuyó la capacidad de inducir apoptosis, por lo que propusieron a hsa-miR-10b-5p como un blanco terapéutico potencial en el tratamiento de cáncer colorrectal. Nuestros resultados también sugieren que este micro RNA está sub regulado, es por ello que consideramos que el miRNA hsa-miR-10b-5p podría estar implicado en el desarrollo tumoral de MPM; mediante su estudio y validación podría proponerse como un posible biomarcador de tipo terapéutico. Sin embargo, en diversos grupos de investigación han propuesto a este miRNA como un oncogén, ya que presenta funciones opuestas a lo ya mencionado. Esta característica se ha evaluado en diferentes tipos de cáncer como el pancreático, hepático, mamario y glioblastoma. Debido a que puede presentar un papel dual, es importante validar mediante diversos ensayos funcionales qué papel puede desempeñar este miRNA en el MPM^{53,54}.

Otro RNA pequeño que se identificó en este trabajo fue el SNORD114-12. Presentó una sobre regulación en las líneas celulares H2452 y MSTO-211H. Sin

embargo, aún no hay reportes en donde se identifique su función, por lo que validar el incremento en su expresión ayudará a entender el papel que realiza en la progresión tumoral de MPM, y con esto proponer el mecanismo de acción de este pequeño RNA.

Uno de los miRNA que presentó un aumento considerable en su expresión fue hsa-mir-432 en la línea celular H2452 (figura 21). Este miRNA se ha evaluado por varios grupos de trabajo; por ejemplo, Burak Akdemir et. Al. Evaluaron su presencia en células de adenocarcinoma esofágico y asociaron sus altos niveles de expresión con el crecimiento tumoral y la resistencia a la quimioterapia, por lo que propusieron que una pérdida en su función podría presentar un efecto opuesto. Es por ello que mediante la técnica de CRISPR-Cas9 inhibieron la expresión de hsa-mir-432 en células de adenocarcinoma esofágico y evaluaron el efecto que tuvo en cuanto a crecimiento celular y sensibilidad al tratamiento con cisplatino. Encontraron que al inhibir este miRNA hubo una disminución en el crecimiento celular y un aumento en la sensibilidad al tratamiento. Debido a que el cisplatino es el fármaco de primera línea empleado para el tratamiento de Mesotelioma Pleural Maligno, identificar el papel de hsa-mir-432 es de suma importancia, ya que podría estar implicado en la resistencia a la quimioterapia en los pacientes con MPM^{55,56}.

Uno de los micro RNA que se considera de mucha relevancia en este trabajo es el hsa-mir-143 debido a que ya ha sido reportado en MPM. Los resultados presentados aquí arrojaron que este miRNA se encuentra sobre regulado en la línea celular MSTO-211H y en las muestras de pacientes con MPM. Esto correlaciona con el trabajo realizado por Sara Busacca et. Al, en donde evaluaron el perfil de expresión en muestras de Mesotelioma Maligno de diferente tipo histopatológico y de líneas celulares mesoteliales, encontrando sobre regulado a este miRNA, por lo que procedieron a validar su expresión en diferentes subtipos histopatológicos de MPM. Los resultados que obtuvieron asocian al miRNA hsa-mir-143 como un posible biomarcador de diagnóstico para la clasificación entre los subtipos, encontrando una sobre regulación en el subtipo epitelioide y una baja expresión en el subtipo bifásico y sarcomatoide. Sin embargo, cabe mencionar que este miRNA puede tener un papel opuesto al mencionado anteriormente, ya que Raúl Garcia et,

al reportaron que el aumento de su expresión en líneas celulares de cáncer de mama inhibe la proliferación y la migración celular, además de que sensibiliza a las células al tratamiento con cisplatino, por lo que proponen a este miRNA como un biomarcador de respuesta a la terapia. De la misma manera, Morten Andersen et al encontraron al miRNA hsa-mir-143 sub regulado proponiéndolo como un biomarcador candidato para el diagnóstico de MPM. Con lo mencionado anteriormente, hay evidencia de que la sobre regulación de este miRNA podría estar implicada en la inhibición de la progresión tumoral. Se deduce que en el presente trabajo se encontró a este miRNA sobre expresado debido a que los pacientes ya habían recibido un tratamiento previamente con gemcitabina, por lo que se podría evaluar la expresión de hsa-mir-143 y definir la relación de la expresión con la tumorigénesis en MPM^{41,57,58,59,60}.

Otro pequeño RNA candidato fue el piRNA hsa-piR-32678 ya que se encontró sub regulado en las muestras de MPM y con una sobre regulación en la línea celular MSTO-211H. Se ha reportado que este piRNA está presente en muestras de epidídimo; sin embargo, aún no hay reportes de ensayos de función de este sncRNA relacionados con cáncer o alguna patología, por lo que validar su papel en MPM es de suma importancia debido a que se encontraron regulaciones opuestas en función de la muestra⁶¹.

Finalmente, el último sncRNA que se considera relevante en este trabajo, es el miRNA hsa-let-7a-2, debido a que también ha sido reportado en MPM. Sara Busacca et. al encontraron el mismo resultado en muestras de pacientes con Mesotelioma Maligno, reportando a este miRNA sobre regulado. El micro RNA hsa-let-7a-2 pertenece a la familia Let-7, familia que es altamente reconocida por su papel como supresores de tumores en varios tipos de cáncer como el de pulmón, leucemia y bucal. En el caso de MPM, el grupo de investigación de Morten Andersen et. al encontró un resultado diferente a este estudio, reportando a este miRNA sub regulado y como posible biomarcador de diagnóstico; sin embargo se ha reportado que un mismo micro RNA puede presentar una expresión opuesta dependiendo del tipo de cáncer o tejido, por ello la importancia de evaluar la implicación de hsa-let-7a-2 en MPM^{41,57,62,63,64}.

En las muestras de pacientes con MPM, solo se obtuvieron sncRNA sobre regulados, este resultado pudo verse asociado al alto grado de degradación de las muestras iniciales, lo que llevó a tener un sesgo en la identificación de pequeños RNAs con una baja expresión, es por ello que el uso de RNA íntegro es crucial para el análisis de secuenciación, a pesar de que por el tamaño de los sncRNA se ha reportado que no suelen sufrir degradación por métodos de conservación como el uso de parafina. Es necesario el aumento de la profundidad de secuenciación, debido a que al RNA degradado también se le asignan lecturas, promoviendo una baja en el número de lecturas esperado para los sncRNA, que a su vez interfieren en la obtención de datos estadísticamente significativos para la evaluación de la expresión diferencial⁶⁵.

De los sncRNAs anteriormente descritos, se llevó a cabo la búsqueda de sus genes blanco, sin embargo, solo se consideraron aquellos genes que fueron reportados previamente en MPM por su importancia en el desarrollo de la enfermedad.

Tal es el caso del miRNA hsa-mir-196, del cual se identificó que uno de sus genes blancos es *Col1a2*, el cual participa en procesos como crecimiento, migración, invasión y metástasis^{66,67,68}.

Para el caso del miRNA hsa-let-7a-2 se identificó que algunos de sus genes blanco son *MAPK3* y *RAS*, los cuales están implicados en mecanismos como la inhibición de la apoptosis, proliferación y migración celular en diversos tipos de cáncer incluido MPM^{66,67,69}.

Debido a la importancia de los genes blanco mencionados, estudiar su participación en el desarrollo de MPM tanto en las líneas celulares como en las muestras de pacientes, brindará información del papel que realizan los RNAs pequeños descritos en este trabajo en la enfermedad.

Finalmente consideramos que los sncRNAs que podrían tener una implicación directa en el desarrollo de MPM son los miRNA: hsa-mir-196 y hsa-let-7a-2. Esta deducción está basada en la literatura reportada. A pesar de que aún no hay reportes de otros pequeños RNAs encontrados en este proyecto y sus implicaciones en MPM, se les puede asociar un papel importante en su desarrollo. El análisis

obtenido nos sugiere que pudiera tener una implicación en diferentes mecanismos asociados a la enfermedad, los siguientes pequeños RNAs son los miRNA: hsa-mir-378a, hsa-mir-182, hsa-miR-10b-5p, hsa-mir-183, hsa-mir-432 y hsa-mir-143, al piRNA hsa-piR-32678, el snoRNA SNORD114-12 y el snRNA RNU5F-1, por lo que es necesario la validación mediante ensayos funcionales de cada uno de ellos y posteriormente determinar su papel directo en sus genes blancos.

10. Conclusiones

Mediante secuenciación masiva, se logró la identificación del perfil de expresión de RNAs pequeños en tres líneas celulares MRC-5, MSTO-211H, H2452 y en muestras de pacientes con MPM. Se identificaron los miRNAs: hsa-mir-196, hsa-let-7a-2, hsa-mir-378a, hsa-mir-182, hsa-miR-10b-5p, hsa-mir-183, hsa-mir-432 y hsa-mir-143, los cuales previamente han sido reportados y son de importancia en diversos tipos de cáncer, por lo que en este trabajo consideramos que podrían tener un papel importante en el desarrollo de MPM, puesto que regulan genes implicados en crecimiento, adhesión, migración, metástasis y resistencia a la quimioterapia en cáncer.

A pesar de que aún no hay reportes de los sncRNAs hsa-piR-32678, SNORD114-12 y RNU5F-1, el análisis de los datos sugieren un papel importante en el MPM, debido a que presentaron una pérdida en su regulación tanto en las líneas celulares como en las muestras de pacientes con MPM. Sin embargo, es necesaria la validación de todos los pequeños RNAs por PCR en tiempo real y ensayos funcionales, para determinar su posible papel en el origen y progresión tumoral de MPM.

11. Perspectivas

A partir del perfil de expresión diferencial obtenido, llevar a cabo el diseño de sondas Taqman de los siguientes sncRNA: hsa-mir-196, hsa-mir-143, hsa-let-7a-2, hsa-piR-32678, SNORD114-12 y RNU5F-1, para identificar y cuantificar los niveles de expresión mediante PCR en tiempo real; este ensayo nos ayudará a validar el análisis bioinformático realizado.

Llevar a cabo ensayos funcionales, los cuales consistirán en sobre o sub expresar los sncRNAs validados por PCR en tiempo real. Esto se realizaría mediante la transfección de células, con las construcciones de los sncRNA que nos ayuden a modular su expresión, empleando promotores tejido específico y así determinar su implicación en diferentes procesos como crecimiento y migración celular.

12. Bibliografía

1. Hanahan D, Weinberg RA. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 144(5):646-674.
2. I.N.Cáncer. Instituto Nacional del Cáncer. Manual de enfermería oncológica. (2012).<http://www.cancer.gov/espanol/recursos/hojasinformativas/deteccion-diagnostico/papanicolaou-respuestas>.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 68(6):394-424.
4. Mohar Betancourt A, Reynoso Noverón N, Armas Texta D, Gutiérrez Delgado C, Torres Domínguez JA. (2017). Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies. *J Glob Oncol*. 3(6):740-748.
5. Aldaco Sarvide F, Pérez Pérez P, Cervantes Sánchez G, et al. (2018) Mortality from cancer in Mexico: 2015 update. *Gac Mex Oncol*. 17(1):28-34.
6. Mutsaers SE. (2004). The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 36(1):9-16.
7. Tolani B, Acevedo LA, Hoang NT, He B. (2018). Heterogeneous contributing factors in MPM disease development and progression: Biological advances and clinical implications. *Int J Mol Sci*. 19(1):1-23.
8. Robinson BM. (2012). Malignant Pleural Mesothelioma: an epidemiological perspective. *Ann Cardiothorac Surg*. 1(4):491-496.
9. Russo G, Tessari A, Capece M, Galli G, Braud F. (2018). MicroRNAs for the Diagnosis and Management of Malignant Pleural Mesothelioma : A Literature Review.
10. Zhang W, Wu X, Zhao X. (2015). Advances in the diagnosis, treatment and prognosis of malignant pleural mesothelioma. *Ann Transl Med*. 3(13):1-8.
11. Thanh T, Van N, Lam N, Dung N, Tabata C, Nakano (2016). Simian virus 40 may be associated with developing malignant pleural mesothelioma. *Oncol Lett*.11(3):2051-2056.
12. Madrigal C, Aguilar G, et al. (2018). Survival analysis of malignant pleural mesothelioma. Research Centre for Advanced Studies. CINVESTAV. Mexico.

13. Saddoughi S, Abdelsattar Z, Blackmon S. (2017). National Trends in the Epidemiology of Malignant Pleural Mesothelioma : A National Cancer Data Base Study. *Ann Thorac Surg*.
14. Ju A, Kelly J, Argote L, et al. (2015). Malignant Pleural Mesothelioma : Accuracy of CT Against Immunohistochemical Test Among Mexican Population. 1-5.
15. Aguilar Madrid G, Pesch B, Calderón Aranda E, et al. (2018). Biomarkers for predicting malignant pleural mesothelioma in a Mexican population. *Int J Med Sci*. 15(9):883-891.
16. Kuroda A, Matsumoto S, Fukuda A, et al. (2019). The mTOR Signaling Pathway Is Associated With the Prognosis of Malignant Pleural Mesothelioma After Multimodality Therapy. *Anticancer Res*. 39(11):6241-6247.
17. Haas AR, Sterman DH.(2013). Malignant Pleural Mesothelioma: Update on Treatment Options with a Focus on Novel Therapies. *Clin Chest Med*. 34(1):99-111.
18. Panadero FR, et al. (2014). Diagnóstico y tratamiento del mesotelioma pleural maligno. *Arch Bronconeumología*.
19. Lee CW, Murray N, Anderson H, Rao SC, Bishop W. (2009). Outcomes with first-line platinum-based combination chemotherapy for malignant pleural mesothelioma: A review of practice in British Columbia. *Lung Cancer*. 64(3):308-313.
20. Califf RM, et al. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med*. 243(3):213-221.
21. García Giménez J, Beltrán García J, Romá Mateo C, Seco Cervera M, Pérez Machado G, Mena Mollá S. (2019). Epigenetic Biomarkers for Disease Diagnosis. Elsevier Inc.
22. Romano G, Veneziano D, Acunzo M, Croce CM. (2017). Small non-coding RNA and cancer. *Star review*. 38(5):485-491.
23. Yu Y, Xiao J, Hann S. (2019). The emerging roles of PIWI-interacting RNA in human cancers. *Cancer Manag Res*. 11:5895-5909.
24. Zhang C. (2009). Novel functions for small RNA molecules. *Curr Opin Mol*

Ther. 11(6):641-651.

25. Großhans H, Filipowicz W. (2008). Molecular biology: The expanding world of small RNAs. *Nature*. 451(7177):414-416.
26. Siomi M, Sato K, Pezic D, Aravin A. (2011). PIWI-interacting small RNAs: The vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12(4):246-258.
27. Weng W, Li H, Goel A. (2019). Piwi-interacting RNAs (piRNAs) and cancer: Emerging biological concepts and potential clinical implications. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 1871(1):160-169.
28. Chalbatani GM, Dana H, Memari F, et al. (2018). Biological function and molecular mechanism of piRNA in cancer. *Pract Lab Med*.
29. Cheng J, Guo JM, Xiao BX, et al. (2011). piRNA, the new non-coding RNA, is aberrantly expressed in human cancer cells. *Clin Chim Acta*.412(17-18):1621-1625.
30. Liang J, Wen J, Huang Z, Chen X, Zhang B, Chu L. (2019). Small Nucleolar RNAs: Insight Into Their Function in Cancer. *Front Oncol*.
31. Zhang D, Zhou J, Gao J, et al. (2019). Targeting snoRNAs as an emerging method of therapeutic development for cancer. *Am J Cancer Res*. 9(8):1504-1516.
32. Dong XY, Guo P, Boyd J, et al. (2009). Implication of snoRNA U50 in human breast cancer. *J Genet Genomics*. 36(8):447-454.
33. Yang X, Li Y, Li L, Liu J, Wu M, Ye M. (2017). snoRNAs are involved in the progression of ulcerative colitis and colorectal cancer. *Dig Liver Dis*. 49(5):545-551.
34. Yoshida K, Toden S, Weng W, et al. (2017). SNORA21 – An Oncogenic Small Nucleolar RNA, with a Prognostic Biomarker Potential in Human Colorectal Cancer. *EBioMedicine*. 22:68-77.
35. Tume L, Cisneros C, Sevillano J, Pacheco-tapia R. (2016). Desregulación de microARN en el cáncer: un enfoque terapéutico y diagnóstico. *Gac Mex Oncol*.
36. Mart V, Federico Á, Ortiz-quintero B. (2018). Secreted and Tissue miRNAs as Diagnosis Biomarkers of Malignant Pleural Mesothelioma.

37. Tan W, Liu B, Qu S, Liang G, Luo W, Gong C. (2018). MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy (Review). 15(3):2735-2742.
38. Kota SK, Balasubramanian S. (2010). Cancer therapy via modulation of micro RNA levels: A promising future. *Drug Discov Today*. 15(17-18):733-740.
39. Riehn M, Klopocki E, Molkenin M, Reinhardt R, Burmeister T. (2011). A BACH2-BCL2L1 Fusion Gene Resulting from a Lymphoma Cell Line BLUE-1. *Cancer*.
40. Reid G, Pel M. et al. (2013). Restoring expression of miR-16: a novel approach to therapy for malignant pleural mesothelioma. 1323-1329.
41. Andersen M, Grauslund M, Ravn J, Sorensen JB, Andersen CB, Santoni-rugiu E. (2014). Diagnostic Potential of miR-126 , miR-143 , miR-145 , and miR-652 in Malignant Pleural Mesothelioma. *J Mol Diagnostics*.
42. Sansores R, Service P. (2014). Identification of Circulating miRNA profiles that Distinguish Malignant Pleural Mesothelioma.
43. Bhatia S, Kaul D, Varma N. (2010). Potential tumor suppressive function of miR-196b in B-cell lineage acute lymphoblastic leukemia. *Mol Cell Biochem*. 340(1-2):97-106.
44. Chen C, Zhang Y, Zhang L, Weakley S, Yao Q.(2011). MicroRNA-196: Critical roles and clinical applications in development and cancer. *J Cell Mol Med*. 15(1):14-23.
45. Ren D, Lin B, Zhang X, et al. (2017). Maintenance of cancer stemness by miR-196b-5p contributes to chemoresistance of colorectal cancer cells via activating STAT3 signaling pathway. *Oncotarget*. 8(30):49807-49823.
46. Jichun Ma, Dehong Wu, Yi J, et al. (2019). miR-378 promoted cell proliferation and inhibited apoptosis by enhanced stem cell properties in chronic myeloid leukemia K562 cells. *Biomed Pharmacother*. 108623.
47. Zhang G, Zhou H, Xiao H, Li Y, Zhou T. (2014). miR-378 is an independent prognostic factor and inhibits cell growth and invasion in colorectal cancer.
48. Krist B, Florczyk U, Pietraszek-Gremplewicz K, Józkwicz A, Dulak J. (2015). The role of miR-378a in metabolism, angiogenesis, and muscle biology. *Int J Endocrinol*.

49. Sontheimer EJ, Steitz JA. (1992). Three novel functional variants of human U5 small nuclear RNA. *Mol Cell Biol.* 12(2):734-746.
50. Luo J, Shi K, Yin S ya, et al. (2018). Clinical value of miR-182-5p in lung squamous cell carcinoma: A study combining data from TCGA, GEO, and RT-qPCR validation. *World J Surg Oncol.* 16(1):1-16.
51. Xu X, Wu J, Li S, et al. (2014) Downregulation of microRNA-182-5p contributes to renal cell carcinoma proliferation via activating the AKT/FOXO3a signaling pathway. *Mol Cancer.* 13(1):1-11.
52. Sun Y, Fang R, Li C, et al. (2010). Hsa-mir-182 suppresses lung tumorigenesis through down regulation of RGS17 expression in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 396(2):501-507.
53. Monroig-Bosque P del C, Shah MY, Fu X, et al. (2018). OncomiR-10b hijacks the small molecule inhibitor linifanib in human cancers. *Sci Rep.* 8(1):1-13.
54. Qin J, Zhou J, Teng L, Han Y. (2018). MicroRNA-10b Promotes Apoptosis via JNK Pathway in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Nephron.* 139(2):172-180.
55. Akdemir B, Nakajima Y, Inazawa J, Inoue J. (2017). miR-432 induces NRF2 stabilization by directly targeting KEAP1. *Mol Cancer Res.* 15(11):1570-1578.
56. Chen L, Kong G, Zhang C, et al. (2016). MicroRNA-432 functions as a tumor suppressor gene through targeting E2F3 and AXL in lung adenocarcinoma. *Oncotarget.* 7(15):20041-20053.
57. Busacca S, Germano S, Cecco L De, et al. (2009). MicroRNA Signature of Malignant Mesothelioma with Potential Diagnostic and Prognostic Implications.
58. Sanada H, Seki N, Mizuno K, et al. (2019). Involvement of dual strands of miR-143 (miR-143-5p and miR-143-3p) and their target oncogenes in the molecular pathogenesis of lung adenocarcinoma. *Int J Mol Sci.*20(18):1-18.
59. Zhao J, Chen Y, Liu F, Yin M. (2018). Overexpression of miRNA-143 Inhibits Colon Cancer Cell Proliferation by Inhibiting Glucose Uptake. *Arch Med Res.* 49(7):497-503.
60. García Vázquez R, Marchat L, Ruíz García E, et al. (2019). MicroRNA-143 is associated with pathological complete response and regulates multiple

- signaling proteins in breast cancer. *Technol Cancer Res Treat.* 18:1-11.
61. Li Y, Wang HY, Wan FC, et al. (2012). Deep sequencing analysis of small non-coding RNAs reveals the diversity of microRNAs and piRNAs in the human epididymis. *Gene.* 497(2):330-335.
 62. Iwasaki T, Tanaka K, Kawano M, Itonaga I, Tsumura H. (2015). Tumor-suppressive microRNA-let-7a inhibits cell proliferation via targeting of E2F2 in osteosarcoma cells. 1543-1550.
 63. Guan H, Zhang P, Liu C. (2011). Characterization and functional analysis of the human microRNA let-7a2 promoter in lung cancer A549 cell lines. 5327-5334.
 64. Jian Lu, Xiqiang L, Zujian Chen, Yi JIN. (2011). MicroRNA-7 targets IGF1R (insulin-like growth factor 1 receptor) in tongue squamous cell carcinoma cells. *Biochem J.* 432(1):199-205.
 65. Li J, Smyth P, Flavin R, et al. (2007). Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnol.* 7:1-6.
 66. Mesothelioma P, Rouka E, Beltsios E, Goundaroulis D, Vavougiou GD. (2019). In Silico Transcriptomic Analysis of Wound-Healing-Associated Genes in Malignant. 1-12.
 67. Barone E, Gemignani F, Landi S. (2018). Overexpressed genes in malignant pleural mesothelioma : Implications in clinical management. 10(Suppl 2):369-382.
 68. Gao X, Zhong S, Tong Y, et al. (2019) Pathology - Research and Practice Alteration and prognostic values of collagen gene expression in patients with gastric cancer under different treatments. *Pathol - Res Pract.*
 69. Ricarte-filho JCM, Fuziwara CS, Yamashita AS, Rezende E, Januário M, Kimura E. (2009). Translational Oncology Effects of let-7 microRNA on Cell Growth and Differentiation of Papillary Thyroid Cancer 1. 2(4):236-241.