

## SINOPSIS

El potencial cancerígeno del amianto comenzó a ser estudiado a mediados de los años cincuenta (1). En los setenta se describió la relación causal entre la exposición al amianto y el desarrollo de MM (2) y se empieza a tomar conciencia de la dimensión que el problema puede adquirir, más allá del impacto del amianto de los centros productivos (3). En 1976, la IARC (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer) estableció que todos los tipos de fibras de amianto pueden provocar mesotelioma y carcinoma de pulmón y negó la posibilidad de definir niveles seguros de exposición (4). España no incorporó con claridad a su ordenamiento jurídico una protección adecuada frente al amianto hasta mediados de los años ochenta.

Como bien se sabe, debido a sus propiedades y bajo precio, el amianto era empleado masivamente en procesos industriales y productos manufacturados desde comienzo del siglo XX y de forma más intensa tras la segunda Guerra Mundial. Así, España consumió en total 2,3 millones de toneladas de amianto aproximadamente, las importaciones de amianto alcanzaron un máximo de 112.000 toneladas en 1973 (5).

La evolución del consumo del amianto ha ido indisolublemente ligada a su impacto sobre la salud de la población (6). Fue a mediados de los setenta cuando se prestó mayor atención a la dimensión preventiva y a la formulación de propuestas para el establecimiento de regulaciones industriales que limitaran los niveles de exposición.

A pesar de su prohibición en 2001, la incidencia de enfermedades relacionadas a la exposición al amianto se ha convertido en un grave problema de salud pública a nivel internacional.

La más grave de estas enfermedades, y por lo tanto la que más preocupa es el mesotelioma maligno (MM), una forma de cáncer que afecta al mesotelio, el revestimiento protector que cubre muchos de los órganos internos del cuerpo. La pleura (el revestimiento exterior de los pulmones y la pared torácica interna) es el lugar más frecuente donde se desarrolla el MM. No obstante, también pueden surgir en el peritoneo (el revestimiento de la cavidad abdominal), y el pericardio (la membrana que rodea el corazón) o la túnica vaginalis (la membrana que rodea a los testículos).

Existen 3 subtipos histológicos de mesotelioma: epitelial, sarcomatoso y bifásico o mixto. El tipo epitelial es el más común (70%) de los mesoteliomas y normalmente conlleva el mejor pronóstico. El sarcomatoide, que representa el 10% de todos los casos, se trata de una forma mucho más agresiva. El diagnóstico se realiza tardíamente debido a que existe un prolongado periodo de latencia (30-40), a la naturaleza inespecífica de los síntomas y a la falta de métodos precisos para detectar la enfermedad en sus etapas iniciales. Debido a estas circunstancias, se trata de un cáncer con un mal pronóstico, con una media de supervivencia tras el diagnóstico de 8 a 12 meses.

La exposición ocupacional al amianto (por vía inhalatoria) es el principal factor de riesgo para el desarrollo del MM, aunque la exposición también puede ser ambiental o doméstica. A nivel mundial, es la causa de muerte de 100.000 personas cada año (7); además, algunos países en desarrollo, como India y

China, continúan con el uso generalizado del amianto, por lo que se espera que la incidencia aumente durante los próximos años a nivel mundial (8).

España ocupa un lugar intermedio en el entorno europeo respecto a la incidencia del mesotelioma. Actualmente, la tasa de incidencia se sitúa en torno a 0,96 caso por cada 100.000 habitantes-año (9). Se prevé, que habrá en España un importante incremento en la mortalidad secundaria a mesotelioma en la presente década (10). Según el estudio publicado por Pitarque et al. (11), las muertes por este tipo de tumor maligno seguirán aumentando al menos hasta 2016, no pudiendo predecirse en qué año empezarán a descender.

Destacar también que la incidencia aumenta de manera lineal en relación con la intensidad de la exposición (12), pero de manera exponencial respecto al tiempo transcurrido desde la primera exposición (13).

En este contexto, creciente incidencia y alta mortalidad, la mejor herramienta disponible para el abordaje de esta patología es la detección precoz.

## **1. AMIANTO**

El amianto son un grupo de minerales fibrosos que se encuentran de forma natural en las formaciones rocosas. Las fibras de amianto son liberadas al aire debido a actividades realizadas por el hombre, o por procesos de deterioro causados por los factores climáticos.

Estas fibras no se disuelven en agua ni se evaporan, son resistentes al calor, al fuego, a la tensión y a la degradación química o biológica. Debido a estas propiedades, las fibras de asbesto se han utilizados en diferentes ocupaciones e industrias: en construcción, minería, en la manufactura de plásticos y cauchos, reparación naval y de camiones, en ferrocarriles, plomería, electricistas, carpinteros, soldadores, entre otros.

### **1.1 TIPOS DE AMIANTO**

Las fibras de amianto se dividen en dos grandes grupos (14), que son las fibras de Serpentina y las fibras de Anfíboles.

En el primer grupo se encuentra el crisolito o amianto blanco. Se consideran menos tóxicas que los anfíboles. El crisolito es la variedad comercial más usada, corresponde a más del 90% del asbesto utilizado en el mundo.

Por otro lado, en el segundo grupo se encuentran los siguientes: amosita o amianto marrón y Crocidolita o amianto azul, es la variedad más peligrosa.

### **1.2 AMIANTO Y SU FRIABILIDAD**

La friabilidad (15) es la característica de los materiales con amianto que tiene más interés desde la perspectiva de prevención de riesgos, y de hecho, es la base de algunas de las clasificaciones para la categorización del puesto de trabajo y “su riesgo inherente” a la exposición.

Se entiende por “friabilidad” la capacidad que tiene un material de liberar las fibras que contiene y ser inhaladas por el manipulador o utilizador. En función de esta característica se establecen dos agrupaciones:

- Materiales friables
- Materiales no friables

Se denomina **material friable** aquel que puede ser disgregado o reducido a polvo con la sola acción de la mano. Estos materiales son susceptibles de liberar fibras como consecuencia de choques, vibraciones o movimiento del aire. Mientras que el **material no friable** es el que necesita herramientas mecánicas para ser desmoronado o reducido a polvo, no desprenden fibras a no ser que sea por la acción directa de máquinas o herramientas. Hay que tener en cuenta que si la manipulación del material no friable requiere necesariamente su rotura, se debe dar al mismo la consideración de material friable, ya que se liberarán fibras de amianto.

La friabilidad depende en primer lugar del tipo de material y de su composición. Algunos componentes, como el cemento, retienen fuertemente las fibras, mientras que otros, como el yeso, producen una retención débil. La friabilidad de un material aumenta cuando envejece y se rompe o deteriora. Los materiales friables son mucho más peligrosos que los no friables.

### **1.3 TIPOS DE EXPOSICIÓN**

#### **1.3.1 EXPOSICIÓN LABORAL**

Son muchas las profesiones asociadas a la exposición (Tabla 1).

**Tabla I.** *Actividades que pueden implicar exposición al amianto.*

Albañilería
Astilleros y desguace de barcos.
Fabricación de filtros
Industrias de aislamientos de amianto.
Industrias de cartonaje
Industrias de fibrocemento.
Industrias textiles de amianto.
Operaciones de demolición de construcciones,
Fabricación y reparación de zapatas de freno y embragues.
Fontanería (Recubrimientos con amianto de tuberías y calderas.)
Tintorería industrial.

Transporte, tratamiento y destrucción de residuos que contengan Amianto.

Carpintería

Camioneros

Trabajadores de la construcción

Carga y descarga de amianto

Construcción

Excavación de pozos petrolíferos.

Fabricación de:

- Aislantes acústicos.
- Aislantes de corcho con agregado de amianto.
- Aislantes térmicos.
- Artefactos y cables eléctricos.
- Asfalto de amianto.
- Baldosas vinílicas reforzadas con amianto.
- Caños de fibrocemento.
- Tuberías de desagüe.
- Cosméticos.
- Filtros con agregado de amianto.
- Guarniciones de embragues y frenos.
- Masilla.
- Materiales de fricción de amianto.
- Papel de amianto.
- Pinturas.
- Planchas de fibrocemento.
- Plásticos.
- Postes y montantes.
- Tablillas de fibrocemento.
- Riplas y cartón de amianto.
- Fragmentación de amianto:
- Garajes.
- Hilandería de fibras de amianto.
- Ignifugación.
- Industria de goma química.

<p>Instalación de caños y hornos.</p> <p>Mecánica del automóvil.</p> <p>Minas de amianto y talco.</p> <p>Molinos de amianto.</p> <p>Refinerías de petróleo.</p> <p>Reparación de guarniciones de embragues y frenos.</p> <p>Revestimiento de caños de fibrocemento.</p> <p>Sistemas de filtración de aire.</p> <p>Soldadores.</p> <p>Tejeduría de fibras de amianto.</p>
--

De una forma concreta y resumida, las profesiones relacionadas con el amianto pueden categorizar en dos grupos:

- Puestos de trabajo en que se utilizaba amianto como materia prima; llamados **utilizadores** (industria del amianto, minería de asbesto, industria textil del amianto, producción de materiales de fricción, etc.).
- Profesiones que de manera indirecta estaban en contacto al manipular materiales que lo contienen, llamados **manipuladores** (metalurgia, refinería de petróleo, plantas de energía, sector de la construcción, mecánicos de automóviles, etc.).

### 1.3.2 EXPOSICIÓN AMBIENTAL NO-OCUPACIONAL

Principalmente debido a:

- **La proximidad de la vivienda a centros de explotación de amianto.** Existe un buen número de casos documentados de exposición ambiental, como el caso de los vecinos de Cerdanyola y Ripollet (Barcelona) (16).
- **La manipulación de fibras de amianto debida a tareas domesticas.** Quienes compartían el domicilio con un trabajador expuesto en su trabajo al amianto y aquellos que tenían exposiciones contaminantes dentro del hogar sufrían exposición doméstica.
- **La realización de otras tareas extra-laboralmente vinculadas al amianto.** Se trata de tareas que se realizaban fuera de la jornada laboral pero que no discrepan en cuanto al manejo de herramientas y en cuanto al manejo de material con amianto.

## **1.4 FISIOPATOLOGÍA DEL AMIANTO**

La alteración de las células mesoteliales y el desarrollo del mesotelioma pueden ser debidos a diversos mecanismos (17):

El daño oxidativo es uno de los mecanismos de carcinogénesis propuesto. Los productos del daño oxidativo que las fibras producen a nivel celular darán lugar a radicales libres que, a posteriori, se comportaran como carcinógenos (18) (19)

Otro posible mecanismo es la alteración celular debida a la eliminación de sustancias bioactivas como citocinas, interleucinas, factores de crecimiento, etc., ocasionadas por el proceso inflamatorio crónico que las fibras de asbesto provocan sobre la serosa pleural. Probablemente, se inicia un proceso inflamatorio con implicación de productos oxidativos que estimulan al macrófago a liberar interleucinas, factor de necrosis tumoral alfa, factor nuclear kappa B, que a su vez incrementarán el número de células inflamatorias y fibroblastos, la secreción de citocinas por los macrófagos y neutrófilos, como la IL-18 (20) o la proteína inflamatoria del macrófago-2, el aumento de síntesis de interferón gama, etc. (21) (22). También se ha encontrado que la interacción entre factores ambientales y la susceptibilidad genética individual podría desempeñar un papel crítico en la etiología de esta neoplasia (23).

## **1.5 BIOMARCADORES**

### **1.5.1 MESOTELINA**

La mesotelina es uno de los biomarcadores del mesotelioma que más se ha estudiado, y actualmente está considerado como el biomarcador con mejor rendimiento diagnóstico y pronóstico para el MM (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35), pero está limitada por una sensibilidad de 47% y 96% de especificidad (36), por lo que su uso como posible instrumento de cribado en personas con exposición significativa al asbesto en el pasado es un tema sujeto a controversias.

En determinadas situaciones, como en pacientes con MM y en otras enfermedades malignas como en el cáncer de ovario y de pancreas, la mesotelina se encuentra sobreexpresada (37).

En el 2007, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) aprobó en Estados Unidos un test comercial para la determinación de SMRP en suero, el ensayo MESOMARK®, desarrollado por Fujirebio Diagnostics Inc. (Malvern, USA) (38). Se trata de un inmunoensayo enzimático (ELISA) tipo sándwich realizado en dos etapas, que detecta la presencia de SMRP en suero humano empleando la detección colorimétrica.

Hasta la fecha, la distribución de SMRP en la población sana ha sido poco explorada. Sin embargo esto es de vital importancia para poder determinar un

cut-off adecuado y así, poder detectar precozmente el MM en la población expuesta al amianto. El valor especificado por la casa comercial MESOMARK® en la técnica es de 1,5nM/L, en contraste con el valor cut-off de 2,5nM/L propuesto por Park et al. (39) . En cambio, para Scherpereel et al. (35) el cut-off diagnóstico es más bajo, de 0,93nM y según en el último metaanálisis publicado, el cut-off seleccionado para evaluar y comparar los resultados de los diferentes autores participantes, ha sido de 2nM/L. Existen causas que justifiquen estas diferencias, como son las estrictamente instrumentales, metodológica, de manejo, de manipulación de las muestras e incluso, posibles diferencias geográficas.

## **1.6 CONTEXTO DE LA INVESTIGACIÓN**

En esta situación, resulta complejo decidir un punto de corte de mesotelina, a partir del cual se deba iniciar la realización de otros estudios y pruebas complementarias para profundizar en el conocimiento del estado de la salud del individuo.

Por otra parte, en España se carece de registros objetivos sobre la exposición laboral que se produjo entre los años 60-80 al amianto, que permitan la categorización del trabajador en cuanto al riesgo de exposición.

Partiendo de este contexto nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Con el objetivo de conocer el Valor de Referencia del Cambio (VRC), estudiaremos la variación biológica tanto interindividual como intraindividual de la SMRP
2. Conocer la estabilidad de esta proteína
3. Elaborar una encuesta que permita recoger de forma objetiva información sobre la exposición a asbesto. Valoración de la misma en un grupo poblacional, y determinación de la concentración de SMRP en dicho grupo.

### **1.6.1 VRC**

Los intervalos de referencia poblacionales (IRP) sirven como puntos de referencia indispensables cuando se evalúan los datos de laboratorio.. Pero esta comparación no siempre es la adecuada, ya que es posible que se produzcan cambios significativos desde un punto de vista clínico aún dentro de los límites marcados por estos intervalos de referencia tradicionales. Estos resultados se hallan influenciados por la variabilidad biológica (VB) propia del paciente y las desviaciones que tienen lugar en las distintas etapas del proceso analítico, englobados en la variabilidad analítica (VA). Por eso, se hace necesaria la implementación de una nueva herramienta que tenga en cuenta estos factores, constituyendo una alternativa a los IRP. Esta herramienta es el valor de referencia del cambio (VRC), que ofrece información sobre cuál es el cambio mínimo necesario para que las diferencias entre dos resultados consecutivos de un individuo sean consideradas como clínicamente

significativas. Esto permite discriminar si la diferencia entre los resultados obtenidos en dos análisis consecutivos en un tiempo determinado se debe a cambios en el estado de salud del paciente o a la variabilidad analítica y/o biológica. Así, se considera que dos resultados consecutivos son significativamente diferentes cuando la diferencia entre los resultados, expresada en porcentaje, es mayor que el VRC.

Para establecer si un cambio de valores en dos exámenes seriados representa un cambio en el estado de salud, deben considerarse el CVa y el CVi. A partir de estos datos se calcula el VRC, según la siguiente fórmula:  $VRC = 2^{1/2} * Z * (CVa^2 + CVi^2)^{1/2}$ . Considerando un score Z de 1,96 para cambios significativos con probabilidad del 95% y de 2,58 para cambios muy significativos con probabilidad del 99%.

La VA o imprecisión de un método cuantitativo corresponde a la dispersión de los valores (desviación estándar) obtenidos para una misma muestra alrededor del promedio (X), expresado en porcentaje, que se calcula a partir de la siguiente fórmula:  $CVa = DE * 100 / X$ .

La VB es la fluctuación fisiológica de los constituyentes de los fluidos orgánicos alrededor de su punto homeostático. Tiene dos componentes: la variación intra-individual e inter-individual, que en términos matemáticos se expresan como coeficientes de variación: CVi y CVg, respectivamente. El CV, como hemos explicado anteriormente, se expresa en porcentajes ( $CV = DE * 100 / X$ ).

Para calcular el coeficiente de variación intra-individual (CVi), se utilizan los datos seriados de un individuo. Pero este primer valor incluye la VB intra-individual más la VA, por lo que a este dato se le debe restar el CVa para obtener el CVi ( $CVi = CV_{i+a} - Cva$ ).

Por otro lado, el coeficiente de variación inter-individual (CVg), se calcula a partir de los datos del total de individuos estudiados. Así, a este CV del total de muestras se le resta la suma del CVi y el CVa ( $CVg = CV_{total} - Cvi + a$ ).

El índice de individualidad (II) de una magnitud biológica también cuestiona la comparación de los resultados individuales con respecto a un intervalo de referencia poblacional, sobre todo cuando se trata de magnitudes con alto grado de individualidad (40).

Se trata del ratio entre la CVi y la CVg ( $II = CVi / CVg$ ). La mayoría de los analitos cuantificados en el laboratorio clínico poseen  $CVi < CVg$ .

Se ha propuesto que en los casos en los que este índice sea bajo, ( $II < 0,6$ ) la utilización de los intervalos de referencia poblacional es de poca utilidad y el VRC constituye la estrategia de interpretación más adecuada. En cambio, si el  $II > 1,4$  se considera que es más útil emplear los intervalos de referencia poblacional (40).

Para finalizar este apartado, en la Tabla II se enuncian todas las fórmulas mencionadas anteriormente.



**Tabla II.** Resumen de las fórmulas para determinar los coeficientes de variación, el VRC y el II.

CVi	$CVi = CVi+a - Cva$
CVg	$CVg = CVtotal - Cvi+a$
VRC	$VRC = 2^{1/2} * Z * (Cva^2 + CVi^2)^{1/2}$
II	$II = CVi / CVg$

### 1.6.2 ESTABILIDAD

La estabilidad metrológica de los componentes de especímenes biológicos humanos es un concepto definido por Guder (41) como “la capacidad de una muestra de retener el valor inicial de las magnitudes biológicas dentro de unos límites establecidos durante un determinado periodo de tiempo cuando ésta se conserva en condiciones definidas”.

Diversos estudios (42) (43) (44) han demostrado que la inadecuada conservación de las muestras antes de su procesamiento influye o modifica la estabilidad de algunas de las propiedades fisico-químicas de sus componentes, provocando que el resultado obtenido sea significativamente diferente del resultado que se obtendría si la muestra se preparase y procesase en condiciones idóneas.

Entre las variables que afectan la estabilidad se encuentran:

- Condiciones en el transporte de las muestras
- Condiciones en la conservación de la muestra desde la extracción hasta su centrifugación o preparación previa al procesamiento.
- Condiciones inherentes al sujeto relacionadas con la variabilidad biológica intra-individual, como factores fisiológicos, patológicos, ingesta de fármacos, y regulación homeostática.
- Condiciones de obtención de la muestra, tales como la dificultad de la extracción, tiempo de aplicación del torniquete y tiempo total del procedimiento de extracción.
- Condiciones propias al contenedor de la muestra: componentes intrínsecos del material, aditivos, conservantes y fases de separación.
- Metodología analítica empleada y propiedad fisico-química que se mide.

### LÍMITE DE ESTABILIDAD

En todo estudio de estabilidad existe una muestra de referencia para cada uno

de los individuos y cada una de las magnitudes en estudio. Se trata de la muestra que no es sometida a las condiciones experimentales. El resto de muestras de cada individuo se someten a la influencia de los diferentes modelos.

Los límites de estabilidad de una magnitud sirven para establecer cuál es la menor variación en la concentración (o actividad) de una magnitud, que no siendo debida a razones analíticas o biológicas, refleja una pérdida de estabilidad de la magnitud en la muestra biológica, a consecuencia de la cual se produzca un error superior al permisible.

Existen tres criterios descritos: criterios estadísticos, metrológicos y biológicos (45). La Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (45) propone un criterio basado en el VRC. Se trata de una combinación del criterio estadístico (se prefija el valor de Z), metrológico (está basado en la variación analítica) y biológico (acota la variación analítica permisible a la variación biológica). La fórmula propuesta para definir la estabilidad (EST) se deduce de la siguiente expresión:

$$EST = 1.65 * CVa$$

Se considera que cuando la diferencia porcentual (DP) observada respecto a la muestra de referencia supere 1,65 veces el coeficiente de variación analítica ( $DP > EST$ ) para una magnitud concreta y un laboratorio determinado, se podría pensar (con una confianza estadística del 90%) que la variación preanalítica producida tiene como consecuencia la pérdida de estabilidad de la magnitud biológica determinada (46). La DP se calcula para cada muestra según la fórmula:  $DP = 100 * (Y - X) / X$ , siendo Y el resultado de la muestra y X su correspondiente valor de referencia.

## **1.7 RESULTADOS**

### **1.7.1 VRC**

El VRC obtenido fue del 27,26% a un nivel de confianza de 95% ( $Z=1,96$ ) y del 67,52% para un nivel de confianza de 99% ( $Z=2,58$ ). Según estos resultados, cualquier diferencia entre dos medidas que supere el VRC podría implicar una modificación clínicamente significativa en el estado de salud del individuo.

En cuanto al II, que se trata del ratio entre CVi y CVg, fue de 0,059. Se puede observar que el CVi es mucho menor que el CVg y tal y como indica el II, SMRP se trata de una magnitud biológica con una fuerte individualidad, es decir, está sometida a una fuerte regulación homeostática.

### **1.7.2 ESTABILIDAD**

Los resultados obtenidos indican que SMRP permanece estable en muestras centrifugadas, tanto a temperatura de refrigeración (entre 4°C y 8°C), como a temperatura ambiente (entre 21°C y 25°C), por lo menos durante 48 horas. Las muestras sin centrifugar, las mantenidas en refrigeración, como las mantenidas a temperatura ambiente, también permanecen estables hasta 8 horas.

### **1.7.3 ENCUESTA**

La puntuación obtenida en la encuesta y el riesgo teórico mostraron una correlación positiva,  $p=0.02$ .

La media  $\pm$  desviación estándar de SMRP fue de  $1,06 \pm 0,49$  nmol/L, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa entre los valores del grupo expuesto y no-expuesto ( $p=0$ )

La concentración de SMRP no se correlacionó con el riesgo teórico asociado ( $p=0.26$ ).

### **1.8 CONCLUSIONES**

1.-La utilización del VRC, para detectar aquellas variaciones clínicamente significativas en un sujeto monitorizado, constituye una alternativa a los IRP, de forma que a lo largo del tiempo cada individuo sería su propio control.

2.-La estabilidad de SMRP en el suero, en diferentes condiciones pre-analíticas, hace que la mesotelina se comporte con robustez para su análisis. Por lo tanto, los problemas técnicos que puedan surgir de la manipulación y almacenamiento de las muestras no limitarían el uso de SMRP.

3.-Son muchas las expectativas que abre la investigación de SMRP para el control del mesotelioma en materia diagnóstica y respuesta al tratamiento, pero según nuestros resultados no así para su utilidad como indicador de exposición.

4.-El puesto de trabajo orienta al riesgo de exposición, pero hace falta estudiar las características individuales de cada trabajador para hacer una determinación más precisa. Esta encuesta puede ser una herramienta estándar de ayuda para ello, al proporcionar información sobre la intensidad-frecuencia de exposición al amianto, sobre todo laboral, pero también ambiental y doméstica.

5.-Debido a su fácil uso, no es fundamental que el personal que intervenga en la evaluación del trabajador tenga formación complementaria y especializada sobre amianto. Sería un buen procedimiento para obtener resultados comparables en cuanto a la evaluación de la exposición.

6.-En una futura investigación, sería necesario ampliar el tamaño de la muestra e incluir puestos de trabajo de otros sectores industriales y volver a analizar la relación entre el riesgo teórico asociado a los trabajadores y la puntuación obtenida en la encuesta en estos casos.

## **METODOLOGÍA**

### **1. MATERIALES**

#### **1.1 ENSAYO MESOMARK Y DS2 Dynex®**

La medición de niveles de SMRP se realizó mediante el kit comercial MESOMARK®, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, y cada una de las muestras de suero se trabajó por duplicado. Los ensayos se realizaron con las muestras codificadas. El instrumento de medida usado fue un DS2 de enzimoimmunoanálisis

### **2. MÉTODOS**

#### **2.1. SUJETOS**

**VRC:** Para determinar la Variación Biológica de las SMRP se tomaron muestras de sangre a un grupo conformado por 7 voluntarios sanos. La obtención de muestras se realizó durante 3 semanas y en total se obtuvieron 5 muestras de sangre por cada individuo.

La Variabilidad Analítica se calculó a partir de los resultados del análisis por duplicado de 15 muestras provenientes de un pool de sueros.

**ESTABILIDAD:** Las muestras de sangre se obtuvieron de 4 voluntarias. A cada individuo se le extrajeron 5 tubos de sangre y todas las muestras fueron extraídas en el propio laboratorio entre las 8:00 y 8:30 de la mañana.

**SELECCIÓN DE GRUPO DE INTERÉS Y CONFECCIÓN DE LA ENCUESTA:** La selección de los individuos participantes se realizó en base al cumplimiento de los siguientes criterios:

- Ser personal laboralmente activo en el periodo de máxima utilización de amianto en España (años 60-80).
- Pertenencia profesional a un puesto de trabajo relacionado con la manipulación de amianto directa o indirectamente.

Para ello se contactó con empresas que dispusieran trabajadores con dichas características.

#### **2.2. PROTOCOLO DE ESTABILIDAD**

Se evaluó el efecto de las variables tiempo, temperatura y centrifugación en la estabilidad de SMRP. Para ello primero se definió un protocolo a seguir, que se define a continuación:

- La variable tiempo se refiere al intervalo de tiempo desde la extracción hasta la obtención del resultado. Se estudiaron los siguientes tiempos:
  - 8 horas/24 horas/48 horas.
- La temperatura se refiere a la temperatura de conservación de las muestras. Se tomaron en cuenta las siguientes situaciones:
  - Congelación/T<sup>a</sup>ambiente/ T<sup>a</sup> refrigeración
- la centrifugación indica si la muestra fue centrifugada o no, antes de su almacenamiento.
  - Con/Sin centrifugación previa al almacenamiento
  -

### **2.3.ENCUESTA**

Con el asesoramiento de los médicos y técnicos de las empresas, fueron descritas las tareas realizadas que se desprendían de cada una de las profesiones seleccionadas, particularmente aquellas actividades relacionadas con el contacto con el amianto. Se valoró el material empleado en cada puesto, la metódica de trabajo, la casuística de patología pleuro-pulmonar y MM en cada profesión y sección, y la duración del desempeño de esta actividad. De esta manera, y en función de los datos descritos se asignó un riesgo teórico a cada profesión.

El riesgo teórico se estableció en base a tres ejes informativos:

- 1.- Tareas concretas vinculadas al amianto en cada profesión.
- 2.- Años en los que las mismas fueron realizadas.
- 3.-Casos de patología pleuro-pulmonar (incluido MM) diagnosticados en cada profesión.

Además de esta información, los médicos de empresa también aportaron la fecha de inicio de la exposición (fecha en la que el trabajador comenzó en un puesto de riesgo), el periodo de latencia de los trabajadores, y cuando fue posible, la duración estimada de la exposición.

De esta manera, las diferentes profesiones se agruparon en función de un riesgo teórico asociado, obteniéndose 10 niveles de riesgo de exposición. Cada familia agrupa diferentes profesiones con el mismo riesgo. Éste fue valorado de 0 a 100.

El objetivo de entrevistar a los trabajadores era asegurar si el trabajador se identificaba con dichas tareas de riesgo, y valorar la frecuencia-intensidad de la exposición.

El cuestionario se realizó en formato digital (Microsoft Office Excel 2007) por un técnico.

No todas las tareas tenían el mismo peso, ya que se consideraba que el nivel de riesgo, en cuanto a la exposición al amianto. Para ello diferenciamos tres tipos de preguntas:

- **Preguntas determinantes (DE):** son aquellas que incluyen la realización de tareas de alto riesgo como utilización de mantas de amianto, de herramientas abrasivas y de sierras; lijado, la retirada de material antiguo, trabajar con amianto friable o junto a alguien que lo hace, utilización de prendas ignífugas de amianto, etc.
- **Preguntas dobles (D):** incluye tareas de riesgo medio como limpieza con aire, taladro, perforación, pinturas, espray, etc.
- **Preguntas simples (S):** se tratan de tareas de menor riesgo como pueden ser la utilización de ropa protectora de amianto, colocación de placas de material aislante de amianto, usar cables con aislante de amianto, etc.

La puntuación asignada a cada tipo de pregunta va acorde con el nivel de riesgo que representan sus tareas ( $S < D < DE$ ) igual que en caso de la frecuencia ( $N < E < R < O < F < D$ ). De esta forma, combinando el riesgo de la tarea con su frecuencia se asigna al trabajador una puntuación no lineal, si no progresiva, que indica el nivel global de exposición.

Cada puesto de trabajo tiene su correspondiente “paquete de preguntas” que incluye las tareas más relevantes de su ocupación que implican contacto con el amianto.

## 2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos se efectuaron mediante el Programa SPSS Statistics 20. La distribución de las variables, tanto en el estudio del VRC, como en el estudio de estabilidad, se realizaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk. La aplicación de fórmulas para el cálculo del VRC, del II y de la estabilidad se realizaron en una hoja de cálculo Excel.

Para valorar el efecto del tiempo, la temperatura y el momento de centrifugación sobre las concentraciones de SMRP se utilizaron ANOVAs de dos factores con medidas repetidas y para la comparación entre la concentración de cada muestra respecto a la muestra de referencia se utilizó la prueba t de Student para variables dependientes (muestras relacionadas). En todos los casos se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ .

Para el estudio de la estabilidad de la muestra, los criterios estadísticos, son múltiples las pruebas que se utilizan, algunas de estas pruebas son análisis de correlaciones, análisis de la varianza (ANOVA) de medidas repetidas, prueba T de Student para datos pareados, etc.

Para analizar los resultados de la encuesta, los datos fueron introducidos en una base de datos creada para tal efecto en el programa estadístico SPSS 20,

aplicación desde la cual posteriormente se realizaron todos los análisis estadísticos que consistían en: estudio descriptivo de la muestra, ANOVA de un factor y análisis correlacionales.

## RESULTADOS

### 1. VRC

La concentración media de SMRP observada en el grupo de estudio fue de  $0,89 \pm 0,70$  nM/L., Los resultados de los CV de SMRP se muestran en la Tabla III.

**Tabla III.** Resultados obtenidos.

PARÁMETRO	CV
CVa	5,43%
CVi	4,07%
CVg	68,98%

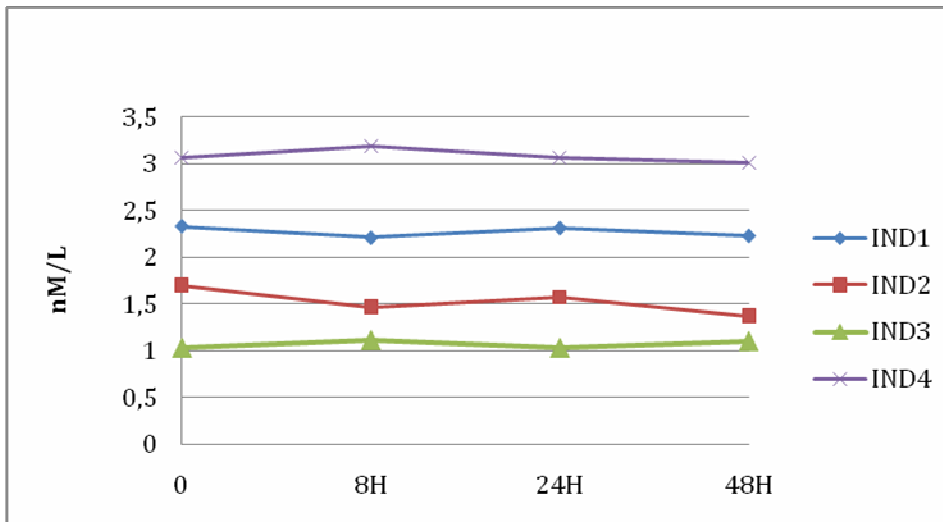
A partir de estos datos se obtuvo el VRC que fue del 27,26% a un nivel de confianza de 95% ( $Z=1,96$ ) y del 67,52% para un nivel de confianza de 99% ( $Z=2,58$ ). Según estos resultados, cualquier diferencia entre dos medidas que supere el VRC podría implicar una modificación clínicamente significativa en el estado de salud del individuo.

En cuanto al II, que se trata del ratio entre CVi y CVg, fue de 0,059.

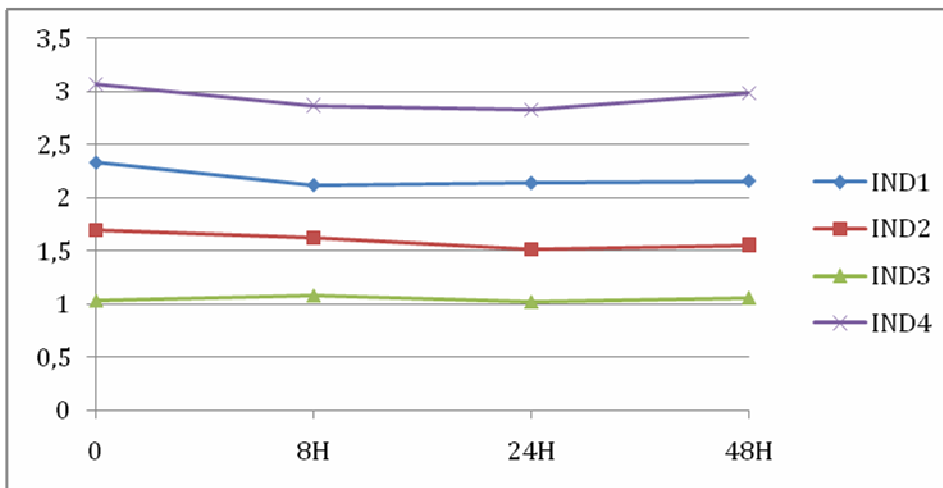
Se puede observar que el CVi es mucho menor que el CVg y tal y como indica el II, SMRP se trata de una magnitud biológica con una fuerte individualidad, es decir, está sometida a una fuerte regulación homeostática.

### 2. ESTABILIDAD:

En las Gráficas 1 y 2 se refleja el comportamiento de SMRP, se muestran las concentraciones de SMRP obtenidas en las diferentes muestras, sujetas a diferentes condiciones (temperatura ambiente o refrigeración), para todos los tiempos estudiados (8h, 24h y 48h) y en los cuatro sujetos.



**Gráfica 1.** Evolución de las concentraciones de SMRP en muestras centrifugadas y conservadas a temperatura ambiente a lo largo de 48 horas.



**Gráfica 2.** Evolución de las concentraciones de SMRP en muestras centrifugadas y a temperatura de refrigeración a lo largo de 48 horas.

Tal y como se observa en las gráficas, no existe un descenso o aumento progresivo en el tiempo. Los resultados estadísticos lo corroboran al no hallarse diferencias significativas entre las muestras en los diferentes tiempos ( $p = 0,45$  para muestras conservadas a temperatura ambiente y  $p = 0,50$  para muestras refrigeradas, es decir,  $>0.05$ ).

Finalmente, se realizaron ANOVAs de medidas repetidas, no encontrándose ninguna diferencia significativa en la interacción de las variables ( $p > 0,38$ ).



### 3. SELECCIÓN DE GRUPO DE INTERÉS Y REALIZACIÓN DE ENCUESTA Y DETERMINACIÓN DE MESOTELINA

La puntuación más alta obtenida en la encuesta fue de 3,64 y 0 la puntuación mínima, con un valor medio de 1,29 puntos. La puntuación obtenida en la encuesta y el riesgo teórico mostraron una correlación positiva,  $p=0.02$ .

Tras la determinación de SMRP en los sujetos entrevistados se obtuvieron los siguientes resultados: media  $\pm$  desviación estándar fue de  $1,06 \pm 0,49$  nmol/L, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa entre los valores del grupo expuesto y no-expuesto ( $p=0$ ) (Tabla IV).

Tabla IV. Concentraciones séricas de SMRP en expuestos y no-expuesto.

CONCENTRACIONES SMRP (nmol/L)	EXPUESTOS (n=60)	NO-EXPUESTOS (n=15)	VALOR DE p*
Media $\pm$ DE	1,13 $\pm$ 0,67	0,76 $\pm$ 0,12	p =0,00
Rango	0,5 – 2,6	0,6 - 0,9	

No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los grupos de riesgo, que agrupaban los riesgos teóricos, tanto para la concentración de SMRP como para la puntuación de la encuesta.

La concentración de SMRP no se correlacionó significativamente con ninguna variable. La edad y la puntuación obtenida en la encuesta presentaron una correlación positiva para el riesgo teórico.

### UTILIDAD PRACTICA DE LOS RESULTADOS EN RELACION CON LA PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES

#### 1. VRC

Los intervalos de referencia poblacional (IRP) son la referencia más habitual para la interpretación de la información producida por el laboratorio. Si bien los IRP son útiles para la interpretación de un resultado aislado, los mismos pueden no serlo cuando se quiere comparar un resultado con el dato previo del mismo paciente, ya que pudo haber un cambio significativo en el valor de la magnitud medida y el resultado obtenido puede estar aún dentro de los IRP. A esto se le añade la dificultad a la hora de interpretar ciertos análisis, como en caso de SMRP, debido a que actualmente no existen IRP, ni tampoco un valor

cut off unánime. Por ejemplo, el valor especificado por la casa comercial Mesomark ® en la técnica es de 1,5 nM/L, cifra por debajo de la cual el 99% de la población estaría sana. En cambio, en el último metaanálisis publicado, el cut-off seleccionado para evaluar y comparar los resultados de los diferentes autores participantes, ha sido de 2nM/L (36).

Ante estos problemas, el VRC ha demostrado ser una herramienta altamente eficaz en la interpretación de la significación clínica de los cambios en los resultados bioquímicos de un individuo (47) (48), ya que toma en cuenta los componentes analíticos y biológicos que contribuyen considerablemente a la variación en las concentraciones de marcadores determinados de manera seriada. Además, el VRC es muy sencillo de calcular, ya que todos los laboratorios pueden conocer la VA de su método y también calcular la VB intra-individual del analito.

Cuando los analitos están firmemente regulados en el cuerpo, la variación intra-individual es más estrecha que la variación inter-individual (el ratio  $CV_i/CV_g$  es pequeño), por lo que la comparación seriada de sus resultados puede dar información útil sobre el estado de salud de la persona.

Los resultados de este estudio demuestran que la concentración de SMRP está estrechamente regulada, tal y como indican los valores de  $CV_i$  obtenidos.

En cuanto al II, introducido por Harris (40), que se ha utilizado para valorar la utilidad de los IRP de los analitos, considerándose realmente útiles si el  $II > 1,4$  y de poca utilidad si  $II < 0,6$ . El II obtenido en este trabajo es de 0,059 y por lo tanto, en este caso los valores de referencia poblacionales no son útiles para la interpretación, si en cambio el VRC.

Se concluye que, de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, el VRC podría ser útil para interpretar determinaciones seriadas de SMRP. Creemos que el VRC representa un avance respecto a los IRP, ya que estos últimos son basados en la población en general, sin embargo, el VRC es específico para cada sujeto y deriva de resultados pasados propios del individuo.

Consideramos que esta herramienta de ayuda a la interpretación de los datos analíticos puede ser un apoyo para el estudio y seguimiento de los trabajadores expuestos al amianto, ya que anticiparse y actuar antes de la aparición de los síntomas puede ser útil para aumentar las tasas de supervivencia actuales, ya que en el caso de detectarse un cambio de esta índole sería conveniente la realización de otras pruebas complementarias que ayuden a profundizar en el estado de salud.

## **2. ESTABILIDAD**

En la literatura médica hay pocos estudios que evalúen la estabilidad de SMRP, pero los resultados obtenidos coinciden con los publicados con estos estudios previos. Siguiendo el criterio propuesto por la Comisión de Calidad Analítica de la SEQC (una combinación del criterio estadístico, metrológico y biológico), ninguna muestra superaba los límites de la estabilidad, ya que no se

hallaron diferencias significativas entre las diversas concentraciones de SMRP y las muestras de referencia.

Por lo tanto, entendemos que para las pruebas de SMRP las muestras son estables.

Los resultados de este estudio sugieren que el procesamiento pre-analítico de las muestras para establecer los niveles de SMRP es flexible y que pequeñas variaciones en el procesamiento pre-analítico, respecto al momento de la centrifugación y el tiempo y la temperatura de conservación de estas muestras, no alteran la concentración de SMRP, ya que no se hallaron diferencias significativas entre las muestras procesadas según los diferentes tratamiento pre-analíticos experimentales establecidos. Lo cual lleva a considerar SMRP sólida y robusta en las condiciones pre-analíticas habituales en los laboratorios clínicos.

Concluimos que la estabilidad de SMRP es una característica beneficiosa que ayuda en el manejo de las muestras, y en el manejo de los sujetos sometidos a programas de vigilancia de la salud post-ocupacional.

### **3. ENCUESTA**

En los años de auge industrial en que se contextualiza el periodo de actividad laboral de los sujetos de estudio, aunque principalmente pertenecían a un puesto de trabajo concreto, en determinadas temporadas o por necesidades organizativas eran desplazados a otras secciones para desempeñar otras tareas.

Tras la realización de las entrevistas a los sujetos participante se observó que personas que tenían el mismo puesto de trabajo e incluso en la misma empresa realizaban tareas diferentes, y con diferente frecuencia, por lo que obtenía una puntuación distinta en la encuesta. Por eso, aunque inicialmente todos los trabajadores pertenecientes a un mismo puesto de trabajo tenían el mismo riesgo teórico, era necesario recategorizar, quedando patente la individualidad en la intensidad de la exposición que la encuesta, de una forma objetiva, era capaz de recoger.

A la hora de recategorizar se tomó como punto de partida el riesgo teórico, y partiendo de este valor, en base a la puntuación obtenida en la encuesta, se ajustó a un riesgo mayor o menor.

La puntuación obtenida en la encuesta y el riesgo teórico mostraron una correlación positiva,  $p=0.02$ . Lo que muestra la utilidad de la encuesta a la hora de imputar un riesgo a un profesional determinado.

Con esta encuesta el riesgo categorizado se adapta a la realidad individual, ya que se trata de la combinación de la información aportada por los médicos de empresa y la información dada por el trabajador.

Creemos que esta información obtenida es de gran utilidad para el manejo de esta población.

Nuestros resultados evidencian diferencias de concentración de SMRP entre sujetos expuestos y no-expuestos ( $p = 0,00$ ), con valores claramente más

elevados en el grupo de expuestos. Estos resultados coinciden con otros autores (49) (50).

Sin embargo SMRP no se correlaciona con el riesgo teórico de exposición ( $p = 0,26$ ), ni con la puntuación de intensidad-frecuencia de la encuesta ( $p = 0,27$ ). En otro estudio que realizaron Creaney y cols. (51) Tampoco se obtuvo ninguna relación entre la exposición acumulativa al amianto y la concentración de SMRP y, según Tomasetti M y Santarelli L (52) los niveles de SMRP en sangre sirven como biomarcador para el diagnóstico precoz de MM, pero no para predecir la exposición.

## **CONCLUSIONES FINALES Y POSIBLES RECOMENDACIONES**

1.-La utilización del VRC, para detectar aquellas variaciones clínicamente significativas en un sujeto monitorizado, constituye una alternativa a los IRP, de forma que a lo largo del tiempo cada individuo sería su propio control.

2.-La estabilidad de SMRP en el suero, en diferentes condiciones pre-analíticas, hace que la mesotelina se comporte con robustez para su análisis. Por lo tanto, los problemas técnicos que puedan surgir de la manipulación y almacenamiento de las muestras no limitarían el uso de SMRP.

3.-Son muchas las expectativas que abre la investigación de SMRP para el control del mesotelioma en materia diagnóstica y respuesta al tratamiento, pero según nuestros resultados no así para su utilidad como indicador de exposición.

4.-El puesto de trabajo orienta al riesgo de exposición, pero hace falta estudiar las características individuales de cada trabajador para hacer una determinación más precisa. Esta encuesta puede ser una herramienta estándar de ayuda para ello, al proporcionar información sobre la intensidad-frecuencia de exposición al amianto, sobre todo laboral, pero también ambiental y doméstica.

5.-Debido a su fácil uso, no es fundamental que el personal que intervenga en la evaluación del trabajador tenga formación complementaria y especializada sobre amianto. Sería un buen procedimiento para obtener resultados comparables en cuanto a la evaluación de la exposición.

6.-En una futura investigación, sería necesario ampliar el tamaño de la muestra e incluir puestos de trabajo de otros sectores industriales y volver a analizar la relación entre el riesgo teórico asociado a los trabajadores y la puntuación obtenida en la encuesta en estos casos.

## BIBLIOGRAFIA

1. *Mortality from lung cancer in asbestos workers.* **Doll R.** s.l. : Br J IndMed, 1955. 12: 81-6.
2. *Diffuse Pleural Mesothelioma and Asbestos Exposure in the NorthWestern Cape Province.* **Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P.** s.l. : Br J Ind Med, 1960. 17: 260-71.
3. *Biological effects of asbestos.* **Whipple HE, editor.** s.l. : Ann N Y Acad Sci, 1965. 132: 1-766.
4. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man:Asbestos.* **International Agency for Research on Cancer.** s.l. : Lyon: IARC, 1977.
5. *Producción, importación y exportación en España de los cuatro compuestos.*  
*En: Carcinógenos en el medio laboral.* **Castejón J, González CA, Rodríguez P, Moncada S, Turuguet D.** 101-110, Barcelona : Quadern CAPS, 1987, Vol. Nº 7.
6. *Ecological association between asbestos-related diseases and historical asbestos consumption: an international analysis.* **Lin, Ro-Ting. et al.** s.l. : Lancet, 2007. 369, 844–849..
7. *Cancer cell secretion of the DAMP protein HMGB1 supports progression in malignant mesothelioma.* **al, Jube S et.** 3290-301, s.l. : Cancer Research, 2012.
8. *Health experts concerned over India's asbestos industry.* **Burki, T.** 375(9715):626–627, s.l. : Te Lancet, 2010.
9. *Pleural mesothelioma incidence in Europe: evidence of some deceleration in the increasing trends.* **Montaro F et al.** s.l. : Cancer Causes and Control, 2003. 14:791-803.
10. *Mesothelioma mortality in men: trends during 1977-2001 and projections for 2002-2016.* **Pitarque, Silvia et al.,** s.l. : Occup. Environ. Med, 2008. vol. 65, núm. 4, pp. 279 y ss.
11. *Mesothelioma mortality in men: trends during 1977-2001 and projections for 2002-2016 in Spain.* **S, Pitarque, et al.** 65(4):279-82, s.l. : Occup Environ Med, 2008.
12. *Final draft: technical support document for a protocol to assess asbestos-related risk.* **Berman DW, Crump KS.** 9345.4-06, s.l. : EPA Report , 2003.
13. *Mesothelioma mortality in asbestos workers: implications for models of carcinogenesis and risk assessment.* **Peto J, Seidman H, Selikoff IJ.** 45(1): 124–135, s.l. : 45(1): 124–135, 1982 January.
14. *Occupational exposure to chrysotile asbestos and cancer risk: a review of the amphibole hypothesis.* **Stayner, LT, Dankovic, DA and Lemen, RA.** Vol. 86, No. 2, pp. 179-186, s.l. : American Journal of Public Health, 1996.

15. *Guía Técnica para la evaluación y prevención de la exposición a amianto durante el trabajo. Trabajo*, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el. 2008.
16. *Mortalidad por mesotelioma pleural en la provincia de Barcelona*. **GEMEBA (Grupo de Estudio de Mesotelioma en Barcelona):González CA, Agudo A, Ruano I, Hernández S, López F, Brosa J, Turuguet D, Bernal X, Ramírez J.** 101:565-569, s.l. : Med Clim Barc, 1993.
17. *Mechanisms of fiber-induced genotoxicity*. **Jaurand, MC.** 5:1073-1084, s.l. : Environ Helth Perspect, 1997.
18. *Oxidative stress and cancer: have we moved forward?* **Halliwell, B.** 401:1-11, s.l. : Biochem J, 2007.
19. *Can oxidative DNA damage be used as biomarker of cancer risk in human? Problem, resolutions and preliminary results from nutritional supplementation studies*. **Halliwell, B.** 29:569-486, s.l. : Free Radical Res, 1998.
20. *Circulating levels of interleukin-18 in asbestos-exposed workers*. **Gangemi, S, et al.** 21:125-9, s.l. : Toxicology Industrial Health, 2005.
21. *Mechanisms in the patogenesis of asbestosis and silicosis*. **Mossman, MG and Churg, A.** 57:1666-80, s.l. : Am J Respir Crit Care Med, 1998.
22. *The molecular basis of asbestos induced lung injury*. **Kamp, DW and Weitzman, SA.** 54:638-52, s.l. : Thorax, 1999.
23. *Genetic-susceptibility factor and malignant mesothelioma in the Cappadocian region of Turkey*. **Roushdy-Hammady, I, et al.** 357:444-445, s.l. : Lancet, 2001.
24. *Serum mesothelin has a higher diagnostic utility than hyaluronic acid in malignant mesothelioma*. **Grigoriu, B, et al.** 42:1046-1050, s.l. : Clin Biochem, 2009.
25. *Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum osteopontin levels*. **Pass, HI, et al.** 353:1564-1573, s.l. : N Engl J Med, 2005.
26. *Serum osteopontin levels--is it time to screen asbestos-exposed workers for pleural mesothelioma?* **Cullen, MR.** 353: 1517-1618, s.l. : N Engl J Med, 2005.
27. *The role of Osteopontin in tumor metastasis*. **Wai, PY and Kuo, PC.** 121:228-241, s.l. : J Surg Res, 2004.
28. *Osteopontin levels in a asbestos exposed population*. **Park, EK, et al.** 15:1362-1366, s.l. : Clin Cancer Res, 2009.
29. *Utility of osteopontin and serum mesothelin in malignant pleural mesothelioma diagnosis and prognosis assessment.* **Grigoriu, BD, et al.** 13:2928-2935, s.l. : Clin Cancer Res, 2007.
30. *Thrombin hydrolysis of human osteopontin is dependet on thrombin anion-binding exosites*. **Myles, T and Leung, LL.** 283:17789-17796, s.l. : J Biol Chem, 2008.

31. *Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding.* **Kazanecki, CC, Uzwiak, DJ and Denhardt, DT.** 102:912-24, s.l. : J Cell Biochem, 2007.
32. *Osteopontin is not a specific marker in malignant pleural mesothelioma.* **Paleari, L, et al.** 24:112-117, s.l. : Int J Biol Markers, 2009.
33. *Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer.* **Fedarko, NS, et al.** 7:4060-4066, s.l. : Clin Cancer Res, 2001.
34. *Comparison of osteopontin, megakaryocyte potentiating factor, and mesothelin proteins as markers in the serum of patients with malignant mesothelioma .* **Creaney, J, et al.** 3:851-857, s.l. : J Thorac Oncol, 2008.
35. *Soluble Mesothelin-related Protein in the Diagnosis of Malignant Pleural Mesothelioma.* **Scherpereel, A, et al.** 173:1155-1160, s.l. : Am J Respir Crit Care Med, 2006.
36. *Serum mesothelin for diagnosing malignant pleural mesothelioma: an individual patient data meta-analysis.* **Hollevoet, K, et al.** s.l. : J Clin Oncol, 2012, Vols. 30:1541-1549.
37. *Mesothelin targeted cancer immunotherapy.* **Hassan, R and Ho, M.** s.l. : Eur J Cancer, 2008, Vols. 44:46-53.
38. *MESOMARK in vitro diagnostic test for mesothelioma.* **Liz, Z, Verch, T and Allard, JW.** 1:137-142, s.l. : Expert Opin Med Diagn, 2007.
39. *Soluble Mesothelin-related Protein in an Asbestos-exposed Population:Dust Diseases Board cohort study.* **Park, EK, et al.** 178:832-837, s.l. : Am J Respir Crit Care Med, 2008.
40. *Effects of intra and inter-individual variation on the appropriate use of normal range.* **Harris, EK.** 20:1535-42, s.l. : Clin Chem , 1974.
41. *The quality of diagnostics samples. Recommendations of the Working group on Preanalytical of the German Society for Clinical Chemistry.* **Guder, W.** Verlag : s.n., 2001.
42. *The preanalytical phase. An important component of laboratory medicine.* **Narayanan, S.** 113:429-52, s.l. : Am J Clin Pathol , 2000.
43. *Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum.* **Boyanton, BL Jr and Blick, KE.** 48(12):2242-7, s.l. : Clin Chem, 2002.
44. *Estabilidad de las magnitudes bioquímicas .* **Cruz, LM, et al.** 21:52-61, s.l. : Quim Clin , 2002.
45. *Comisión de Garantía de la Calidad y Acreditación de Laboratorios. Definición del límite de estabilidad de las magnitudes en las muestras biológicas.* **Alsina, MJ and González-Oller, C.** 25:81-5, s.l. : Quim Clin, 2006.
46. *Effect of serum-clot contact time on clinical chemistry laboratory results.* **Hang, DJ, et al.** 44:1325-33, s.l. : Clin Chem, 1998.

47. **Fraser, CG.** *Biological variation: from principles to practice.* s.l. : Amer. Assoc. for Clinical Chemistry, 2001. ISBN 1-890883-49-2.
48. *The reference change value a proposal to interpret laboratory reports in serial testing based on biological variation.* **Ricos, C, et al.** 64:175-84, s.l. : Scan J Clin Lab Invest, 2004.
49. *Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma.* **Robinson BW, Creaney J, Lake R, et al.,** 362:1612-1616, s.l. : Lancet, 2003.
50. *Assessment of biomarkers in asbestos-exposed workers as indicators of cancer risk.* **Amati M, Tomasetti M, Mariotti L, Tarquini LM, Valentino M, Santarelli L.,** 655 (1-2):52-8, s.l. : Mutat Res, 2008 Aug-Sep.
51. *Serum mesothelin for early detection of asbestos-induced cancer malignant mesothelioma.* **Creaney J, Olsen NJ, Brims F, Dick IM, Musk AW, de Klerk NH, Skates SJ, Robinson BW.** 19 (9):2238-46, s.l. : Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010 Sep.
52. *Biomarkers for Early Detection of Malignant Mesothelioma:Diagnostic and Therapeutic Application.* **Tomasetti M, Santarelli L.,** 2:523-548, s.l. : Cancers, 2010.