10 años fortaleciendo lazos por una investigación biomédica de calidad

X CONGRESO NACIONAL BIOBANCOS
València 17 y 18 octubre 2019

Nº póster: P-60-OTR

VALIDACIÓN DE MLH1 Y MSH2 COMO MARCADORES DE CALIDAD ASOCIADOS A LA EDAD DE LA MUESTRA EN TEJIDO PULMONAR PARAFINADO

Rejón Garcia, Juan David[1,20]; Alenda González, C[2,20]; Iglesias Coma, M[3,20]; Almenara González, I[4,20]; Esteva-Socias, M[5,20]; Astudillo González, Aurora[6,20]; Escalante Pérez, María[7,20]; Fraga Rodríguez, Máximo[8,20]; Guerrero, Carmen[9,20]; Almeida Parra, María[10], Arenaz Villalba, Izaskun[11,20]; Bahamonde, Olga[12,20]; Belar, Oihana[13,20]; Bermudo Gascón, Raquel[14,20]; Denuc, Amanda[13,20]; Encabo Berzosa, María del Mar[11,20]; Escámez Martínez, Teresa[15,20]; Giraldo Jiménez, Cindy[11,20]; Jauregui, Laura[16,20]; Novoa, Isabel[17,20];Peiro Chova, Lorena[12,20]; Rábano, Alberto[18,20]; Rebolledo Poves, Ana Belén[9,20]; Ruíz Miró, María[19,20]; Serrate, Anna[19,20]; Tora, Montserrat[3,20]; Vieiro Balo, Paula[8,20]; Villar, Virginia[15,20]; Villena Portella, Cristina[5,20]; Artiga González, MJ[4,20]

Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía[1], Biobanco ISABIAL[2], MAR Biobanc, Biobanco del Consorci Mar Parc de Salut de Barcelona[3], Biobanco CNIO[4], Plataforma Biobanco Pulmonar CIBERES[5],Biobanco del Principado de Asturias[6], Biobanco A Coruña, Biobanco INIBIC[7], Biobanco del Complejo Hospitalario de Santiago de Compostela[8], Biobanco del Hospital Universitario Fundación Alcorcón (HUFA)[9], Biobanco de la Fundación GEICAM de Investigación en Cáncer de Mama[10], Biobanco del Sistema de Salud de Aragón (IACS)[11], Biobanco INCLIVA[12], Biobanco Vasco (www.biobancovasco.org). Fundación Vasca de Innovación e Investigación Sanitarias (BIOEF)[13], Biobanco HCB-IDIBAPS[14], Biobanco en Red de la Región de Murcia, Biobanco IMIB[15], Biobanco Universidad de Navarra[16], Biobanco HUVH Vall D'Hebron Institut de Recerca (VHIR)[17], Banco de Tejidos Fundación CIEN[18], Biobanco IRB-Lleida[19], Red Nacional de Biobancos (RNBB) ISCIII[20].

INTRODUCCIÓN y OBJETIVO

El proyecto multicéntrico **OPTIMARK** está centrado en la búsqueda de marcadores de calidad para evaluar el efecto de la variabilidad preanalítica sobre muestras de tejido sólido. Este proyecto está enmarcado en la línea 2 del programa I+D+i de la Red Nacional de Biobancos (RNBB) y está siendo llevado a cabo por 20 centros de la RNBB. Resultados previos del grupo han identificado varios genes de la ruta MMR (*MisMatch Repair*) reparadora de errores de despareamiento de bases de ADN, como posibles marcadores asociados a la edad de muestras parafinadas en tejidos de colon, pulmón y mama, utilizando la tecnología de tinción aportada por el equipo Ventana *BenchMark Special Stain* de Roche. El **objetivo** de este estudio ha consistido en validar los resultados previamente obtenidos con otra plataforma de tinción diferente y en condiciones analíticas distintas, con vistas a una posible implementación como control de calidad en los biobancos de la RNBB.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se construyó un MicroArray Tisular (TMA) con 25 casos de tejido pulmonar sano parafinado procedente de distintos Biobancos de la RNBB, agrupados en función del tiempo de almacenamiento:

	CONTROL	GRUPO A	GRUPO B	GRUPO C	GRUPO D
Tiempo de almacenamiento	< 1 año	1-5 años	5-10 años	10-20 años	>20 años

Tabla 1. Estratificación por tiempo de almacenamiento

Se obtuvieron secciones que se tiñeron con los anticuerpos MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 de dos casas comerciales diferentes -Roche y Dako- utilizando la plataforma de tinción propia de cada una, Ventana *BenchMark Special Stains* (Roche) y *Autostainer XL* (Dako). Las diferentes combinaciones de anticuerpo y plataforma de tinción que se emplearon se muestran en la Tabla 2.

Finalmente, se cuantificó la intensidad de la señal inmunohistoquímica (IHQ) y el porcentaje de células intensamente teñidas (*Aperio Versa 200*, Leica) en cada una de las tinciones.

Tinción	Anticuerpo	Plataforma de Tinción
Tinción 1	Roche	Roche
Tinción 2	Dako	Dako
Tinción 3	Roche	Dako
Tinción 4	Dako	Roche

Tabla 2. Estratificación por anticuerpo y plataforma de tinción

Para analizar la posible correlación entre la edad de la muestra y la expresión de MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, se aplicó el test de Pearson con el programa estadístico GraphPad. Valores de $p<0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

COMPARATIVA DE SISTEMAS DE TINCIÓN ROCHE Y DAKO

La expresión de MLH1 y MSH2 está inversamente correlacionada con la edad de la muestra, independientemente de la plataforma de tinción utilizada.

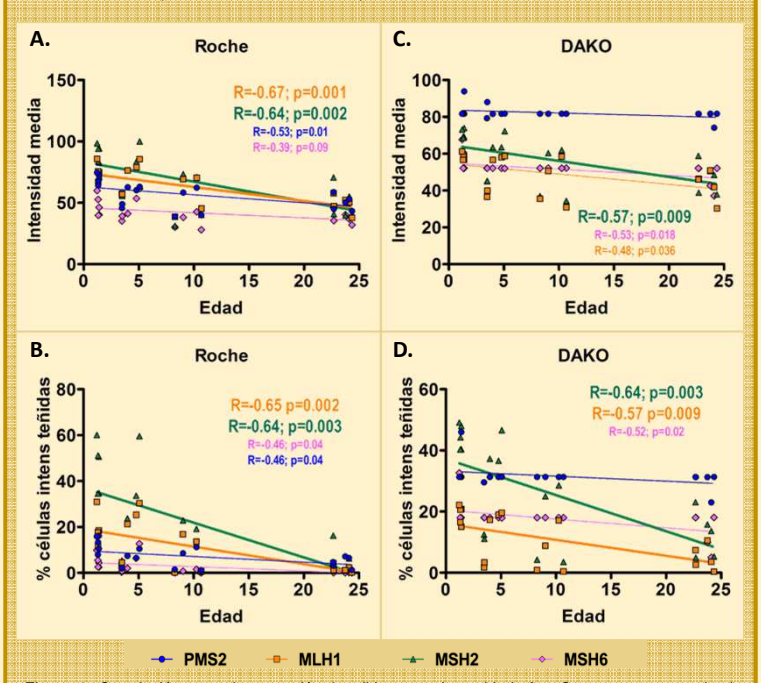

Figura 1. Correlación entre la expresión (medida como intensidad, A y C o como porcentaje de células intensamente teñidas, B y D) y la edad de la muestra para los 4 marcadores estudiados.

ESTUDIO DE TINCIONES CRUZADAS

Las diferencias entre las plataformas no pueden explicarse solamente por diferencias en el anticuerpo o por diferencias en el protocolo de tinción, puesto que no se reproduce el patrón obtenido (*Fig. 1*) cuando analizamos las tinciones cruzadas (anticuerpo de una casa comercial y sistema de tinción de otra).

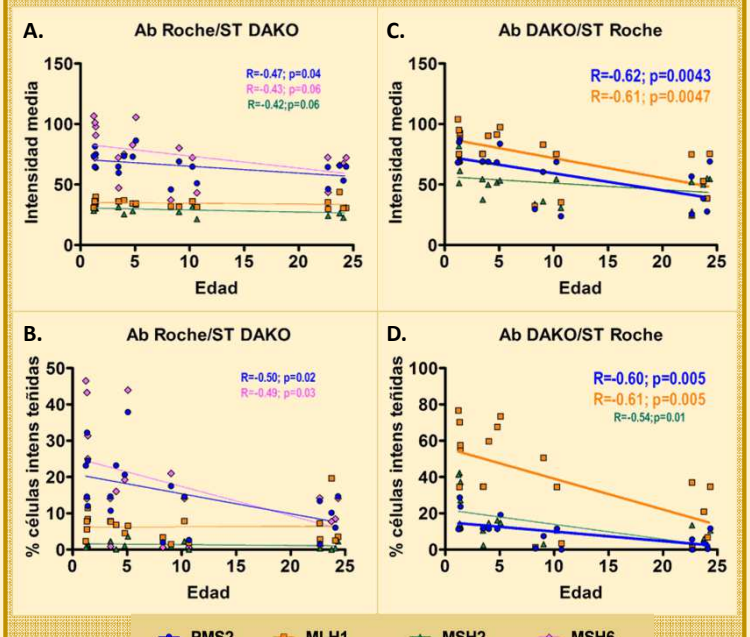

Figura 2. Correlación entre la expresión y la edad de la muestra, medidas a partir de tinciones realizadas con el anticuerpo de Roche y el protocolo de Dako (A y B) y viceversa (C y D).

CONCLUSIONES

- MLH1 y MSH2 han sido validados como marcadores de calidad asociados de manera significativa con la edad de muestras de tejido pulmonar parafinado sano empleando ambas plataformas de análisis.
- Existen diferencias en la expresión IHQ de marcadores de la vía MMR empleando distintos sistemas de tinción.
- Las diferencias encontradas entre los dos sistemas no son debidas enteramente al anticuerpo o al protocolo de tinción empleados.