

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



CONTROL DE CALIDAD DEL RNA DE LAS MUESTRAS DEL BIOBANCO DEL IVO

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Curso Académico: 2015-2016



ALUMNA: Érika Ortiz Domingo

TUTOR UPV: D. José Ramón Murguía Ibáñez

TUTOR EXTERNO: D. José Antonio López Guerrero

Valencia, Julio 2016

Autor: Érika Ortiz Domingo

Tutor Académico: Prof. D. José Ramón Murguía Ibáñez

Cotutor: Prof. D. José Antonio López Guerrero

Localidad y fecha: Valencia, Julio 2016

Tipo de licencia: *Creative commons: Atribución – NoComercial – SinObraDerivada (CC BY-NC-ND)*

Título: Control de calidad del RNA de las muestras del Biobanco del IVO.

Resumen: La extracción y obtención de RNA de alta calidad a partir de muestras biológicas es de gran importancia para poder llevar a cabo los análisis posteriores necesarios, sobre todo en los estudios relacionados con el campo de la investigación biomédica, evitando así la obtención de resultados y conclusiones erróneas.

Sin embargo, el RNA es una molécula poco estable y que se puede degradar fácilmente debido a ciertos factores, como el procesamiento inadecuado de la muestra, condiciones de almacenamiento no óptimas, errónea extracción y otros aspectos en su manipulación a tener en cuenta.

El presente proyecto tiene como objetivo elaborar un protocolo de control de calidad del RNA de muestras almacenadas en el Biobanco de la Fundación Instituto Valenciano de Oncología (IVO) evaluando ciertos parámetros críticos, como son la concentración, la pureza, la integridad y la funcionalidad del RNA. De esta forma, se podrá comparar la calidad de las muestras procedentes de los pacientes oncológicos almacenadas en el Biobanco del IVO, permitiendo una estandarización de los procesos necesarios a la hora de determinar la calidad de una muestra patológica.

Para cumplir con este objetivo, se analizó un total de 100 muestras, 50 de tejido en fresco congelado y 50 de tejido fijado e incluido en parafina (FFPE), de diferentes años (1999, 2005, 2013, 2014 y 2015). A partir de estas muestras, se extrajo el RNA y se procedió a la determinación de su calidad. En primer lugar se cuantificó la cantidad de estos ácidos nucleicos, y posteriormente se estudiaron los parámetros que permiten evaluar la calidad de los mismos: pureza, integridad y funcionalidad.

Tras los estudios realizados y los resultados obtenidos, se pudo demostrar que el diferente método de conservación influye en gran medida en la calidad del RNA, pues las muestras de tejido en fresco congelado obtuvieron mejores resultados; quedó reflejado de este modo que la fijación e inclusión en parafina es responsable de la degradación del material genético, por lo que se tienen que tener en consideración diversos factores (como los medios fijativos empleados y el tiempo de fijación) para evitar comprometer la calidad de la muestra en lo que a RNA se refiere. Por otro lado, quedó constancia de que la antigüedad de una muestra juega también un papel importante a la hora de conservar este RNA, pues el extraído a partir de tejido de una mayor antigüedad contaba con una menor calidad.

Palabras clave: Biobanco, oncología, muestras biológicas, calidad, RNA, FFPE

Title: RNA quality control of the IVO's Biobank samples.

Abstract: The extraction of good quality RNA from biological samples is very important to carry out further analysis, especially in studies related to the biomedical research, and avoid getting erroneous results and conclusions.

However, RNA is an unstable molecule that can easily be degraded due to certain factors, including inadequate sample processing, non-optimal storage conditions, erroneous extraction and many others factors to consider.

This project aims to develop a quality control protocol evaluating certain critical parameters, such as concentration, purity, integrity and functionality of the RNA. In this way, it will be possible to compare the quality of samples from cancer patients stored at the IVO's Biobank, allowing the standardization of the processes needed to determine the quality of a pathological sample.

In order to reach this objective, a total of 100 samples, 50 fresh frozen tissue and 50 formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) of different years (1999, 2005, 2013, 2014 and 2015) was analyzed. From these samples, the RNA was extracted and the determination of its quality was performed. At first, the amount of this type of nucleic acid was quantified, and then, the parameters for assessing the quality were studied: purity, integrity and functionality.

After the performed studies and the obtained results, it could be demonstrated that the different conservation method influences the quality of RNA, because fresh frozen samples obtained better results; thus, it was confirmed that the fixation and paraffin embedding is responsible of degradation of genetic material, so must take into consideration some factors (such as the fixative used and the fixation time) to avoid compromising the quality. Besides this, the age of a sample also plays an important role in preserving this RNA, because this one extracted from tissue stored during more years had a lower quality.

Key words: Biobank, oncology, biological samples, quality, RNA, FFPE

Agradecimientos

Agradezco a todo el personal del Laboratorio de Biología Molecular de la Fundación Instituto Valenciano de Oncología su apoyo y su ayuda en todo momento, a José Antonio por ofrecerme la oportunidad de realizar este trabajo y estar dispuesto siempre a enseñar, y a Patricia por aguantarme y compartir su tiempo conmigo. Trabajar con un equipo como vosotros ha sido un verdadero placer, me he encontrado muy a gusto en el laboratorio y la experiencia me ha aportado mucho tanto a nivel profesional como personal.

Gracias a mis amigos. Aquellos que me han acompañado durante estos 4 años, y que sin duda, han marcado la diferencia; porque con vosotros, las dificultades no suponían ningún obstáculo, porque habéis conseguido hacer todo mucho más fácil y porque os habéis convertido en mi pilar fundamental. Gracias por cada momento compartido y por vuestro apoyo incondicional.

A los de siempre, también gracias. Por seguir ahí a pesar de todo.

Por último, agradecer a mi familia por apoyarme siempre y respetar las decisiones que he ido tomando. Vuestra paciencia no es pequeña.

Índice

1. Introducción	1
1.1. El cáncer	1
1.2. Importancia de la calidad de las muestras	1
1.3. Almacenamiento de muestras	2
1.3.1. Centros de Recursos Biológicos	2
1.3.2. Biobancos	3
1.4. Métodos de almacenamiento	4
1.4.1. Congelación	4
1.4.1.1. Nitrógeno líquido	5
1.4.1.2. Isopentano	5
1.4.1.3. O.C.T.™	5
1.4.2. Fijación en formalina e inclusión en parafina	5
1.5. Particular importancia de la calidad del RNA	7
1.5.1. Extracción del RNA	7
1.5.2. Determinación de la calidad	9
1.5.2.1. Pureza	9
1.5.2.2. Concentración	10
1.5.2.3. Integridad	11
1.5.2.4. Funcionalidad	13
2. Objetivos	15
3. Materiales y métodos	16
3.1. Muestras	16
3.2. Extracción de RNA	16
3.2.1. Tejido en fresco	16
3.2.2. Tejido fijado e incluido en parafina	18
3.3. Determinación de la calidad	19
3.3.1. Ratios de absorbancia	19
3.3.2. Cuantificación	19
3.3.3. RT-qPCR	20
3.3.4. Microelectroforesis capilar	22
3.4. Análisis estadístico	23
4. Resultados y discusión	24
4.1. Resultados	24
4.1.1. Extracción y cuantificación	24
4.1.2. Determinación de la calidad	27
4.1.2.1. Pureza	27
4.1.2.2. Integridad	30
4.1.2.3. Funcionalidad	31
4.2. Discusión	34
5. Conclusiones	36
6. Bibliografía	37
7. Anexo	41

Índice de tablas

Tabla 1.	Muestras empleadas para el estudio	16
Tabla 2.	Número de casos y métodos de congelación por años	16
Tabla 3.	Composición de la mezcla de reacción de la RT	20
Tabla 4.	Programa de temperaturas para la retrotranscripción	21
Tabla 5.	Composición de la mezcla de reacción de la qPCR	22
Tabla 6.	Programa de temperaturas para la qPCR	22
Tabla 7.	Cuantificaciones de los 50 casos tanto por método espectrofotométrico (NanoDrop®) como por método fluorométrico (Qubit®)	24
Tabla 8.	Valores de cuantificación con Nanodrop® en muestras de tejido en fresco	24
Tabla 9.	Valores de cuantificación con Nanodrop® en muestras de tejido fijado e incluido en parafina	25
Tabla 10.	Valores de cuantificación con Qubit® en muestras de tejido en fresco.....	25
Tabla 11.	Valores de cuantificación con Qubit® en muestras de tejido fijado e incluido en parafina	25
Tabla 12.	Ratios de absorbancia del total de muestras a estudio	27
Tabla 13.	Valores del ratio A_{260}/A_{280} de muestras de tejido en fresco	28
Tabla 14.	Valores del ratio A_{260}/A_{280} de muestras de tejido fijado e incluido en parafina.....	28
Tabla 15.	Valores del ratio A_{260}/A_{230} de muestras de tejido en fresco	29
Tabla 16.	Valores del ratio A_{260}/A_{230} de muestras de tejido fijado e incluido en parafina.....	29
Tabla 17.	Valores del RIS	30
Tabla 18.	Valores del <i>Cycle Treshold</i> de las reacciones en cadena de la polimerasa	31
Tabla 19.	Valores del Ct (gen <i>assay</i> : microglobulina) de muestras de tejido en fresco ...	32
Tabla 20.	Valores del Ct de microglobulina de muestras fijadas e incluidas en parafina.....	32
Tabla 21.	Valores del Ct (gen <i>assay</i> : GAPDH) de muestras de tejido en fresco.....	33
Tabla 22.	Valores del Ct del gen GAPDH de muestras fijadas e incluidas en parafina.....	33

Índice de figuras

Figura 1.	Muestras de orina almacenadas en el Biobanco del IVO	4
Figura 2.	Diagrama de flujo sobre la recogida de muestras tisulares de un Biobanco.....	6
Figura 3.	Dogma Central de la Biología Molecular	7
Figura 4.	Espectro de absorción típico de los ácidos nucleicos	10
Figura 5.	Ejemplo de bandas ribosomales en gel de agarosa	11
Figura 6.	Cromatograma realizado con electroforesis capilar	12
Figura 7.	Cromatogramas de electroforesis capilar de muestras con diferentes RIN, por tanto, diferentes niveles de degradación	12
Figura 8.	Influencia del RIN en el <i>Crossing Point</i> o <i>Cycle Treshold</i>	13
Figura 9.	Mecanismo de acción de las sondas <i>TaqMan</i> [®] en la qPCR	21
Figura 10.	Representación de las diferentes concentraciones (meduradas con NanoDrop [®]) de RNA que se consiguieron obtener tanto en tejido fresco congelado como tejido fijado e incluido en parafina a lo largo de los años	25
Figura 11.	Representación de las diferentes concentraciones (meduradas con Qubit [®]) de RNA que se consiguieron obtener tanto en tejido fresco congelado como tejido fijado e incluido en parafina a lo largo de los años	26
Figura 12.	Representación de los ratios de pureza (A_{260}/A_{280}) de ambos tipos de tejido en los diferentes años	28
Figura 13.	Representación de los ratio A_{260}/A_{230} de los dos tipos de muestra a lo largo de los años	29
Figura 14.	Electroferogramas donde se representa el tamaño de la molécula frente a la intensidad de fluorescencia	31
Figura 15.	Representación del Ct (microglobulina) de las muestras de los diferentes años	32
Figura 16.	Representación del Ct (GAPDH) de las muestras de los diferentes años	33
Figura 17.	Ejemplo de <i>Amplification Plot</i> . Ciclos de amplificación frente a fluorescencia emitida de un conjunto de muestras	34

Abreviaturas

AP: Anatomía Patológica

BioFIVO: Biobanco de la Fundación Instituto Valenciano de Oncología

BOE: Boletín Oficial del Estado

cDNA: DNA complementario

Cp: *Crossing Point*

CRB: Centro de Recursos Biológicos

Ct: *Cycle Treshold*

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

FFPE: Fijado en Formalina y Embebido en Parafina

FRET: Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia

GAPDH: Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa

IARC: *International Agency of Research on Cancer*

IgG: Inmunoglobulina G

I+D: Investigación y Desarrollo

mRNA: RNA mensajero

NCI: *National Cancer Institute*

OCTE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

OEIC: *Organisation of European Cancer Institutes*

OCT: *Optimal Cutting Temperature*

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PNT: Procedimiento Normalizado de Trabajo

qPCR: PCR cuantitativa

RIN: *RNA Integrity Number*

RIS: *RNA Integrity Score*

RNA: Ácido Ribonucleico

RT-PCR: PCR de transcripción inversa

RT-qPCR: Transcripción inversa y PCR cuantitativa

RVB: Red Valenciana de Biobancos

TB: Técnico de Laboratorio

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. En 2012, se diagnosticaron un total de 14 millones de casos nuevos, y se produjeron 8.2 millones de muertes relacionadas con esta patología, de las cuales un 65% se dieron en regiones subdesarrolladas (NATIONAL CANCER INSTITUTE, NCI, 2012). El envejecimiento, además, es un factor fundamental en la aparición del cáncer debido a que se acumulan determinados factores que promueven que aumente el riesgo de desarrollo de esta patología. Por ello, el aumento progresivo de la esperanza de vida en la sociedad actual irá ligado al aumento de la incidencia del cáncer, concretamente un 70% en los próximos 20 años (INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER, IARC, 2013).

Por esta razón, **el cáncer constituye un problema de Salud Pública de primera magnitud**, de ahí que la investigación del cáncer desde diferentes aproximaciones (prevención, diagnóstico precoz, medicina personalizada, etc.) represente una prioridad en cualquier estrategia científica y sanitaria.

Uno de los aspectos fundamentales en el abordaje de una enfermedad tan compleja como el cáncer lo constituye el conocimiento de las bases moleculares de la patogénesis y progresión de los tumores. El conocimiento de estos mecanismos bioquímicos y las alteraciones genéticas asociadas a este conjunto de enfermedades ha derivado en la necesidad de identificar nuevos targets terapéuticos. Es por ello que la investigación oncológica centra sus esfuerzos tanto en la identificación de nuevos biomarcadores que permiten una medicina personalizada, tratando de conseguir un pronóstico y tratamiento que se adecuen a las características fisiopatológicas de la enfermedad del paciente, como en el desarrollo de nuevos fármacos que interfieran con los mecanismos patológicos propios del mismo.

Los **estudios de expresión génica** son fundamentales a la hora de determinar la posible existencia de estos nuevos marcadores, y poder comparar así entre distintos subgrupos de pacientes (con tumores más o menos agresivos), o bien estudiar las diferencias que se pueden dar, a nivel de expresión, entre casos y controles, permitiendo descubrir qué hace a un individuo más propenso a sufrir una determinada patología. Analizar el perfil de expresión génica y la secuencia del DNA se convierte, por tanto, en una tarea esencial para reflejar los verdaderos cambios genómicos que pueden producir la enfermedad, requisito imprescindible en la medicina genómica (Groelz *et al.*, 2013).

Es por ello que, principalmente **en este nuevo enfoque, sea primordial contar con una óptima preservación de los componentes celulares, como las proteínas, y en especial con un material genético de alta calidad.**

1.2. Importancia de la calidad de las muestras

En este nuevo punto de vista molecular de la medicina, el estudio y análisis de las muestras clínicas tumorales adquiere gran importancia, puesto que de ellos derivan los resultados experimentales y las conclusiones terapéuticas. Por tanto, es de vital necesidad contar con

muestras de alta calidad que sean representativas del tejido para poder así llevar a cabo los correspondientes estudios posteriores y evitar comprometer los resultados. Manipular muestras que no cuenten con una calidad mínima puede dar lugar a falsos negativos y a conclusiones que no se corresponden con el estado patológico del tejido inicial (Imbeaud *et al.*, 2005).

Esto adquiere gran importancia en el ámbito de la investigación, pues se trata de un proceso desarrollado a lo largo de varios años, abarcando incluso hasta décadas, por lo que las muestras deben ser almacenadas y manipuladas de tal forma que a partir de ellas se pueda obtener suficiente material de buena calidad sobre el cual trabajar. Un material preservado en buenas condiciones y asociado a la pertinente información clínica constituye una base sólida a partir de la cual construir hipótesis de trabajo que deriven en conclusiones firmes e inequívocas.

1.3. Almacenamiento de muestras

Uno de los recursos más importantes para el desarrollo de los estudios genéticos y moleculares de las enfermedades humanas es la disponibilidad de muestras de tejidos patológicos procedentes de pacientes. Estos recursos biológicos constituyen la fuente de las actividades de I+D y respaldan así cualquier investigación oncológica, dando lugar a muchos de los descubrimientos que permiten el desarrollo de la biotecnología en nuestra sociedad.

Para el éxito de estos estudios de investigación, se necesita disponer de una amplia colección de muestras de alta calidad y preservadas en excelentes condiciones, y fomentar también la estrecha colaboración actual entre diferentes laboratorios situados dentro y fuera de los distintos países.

Surge, por tanto, la necesidad de crear repositorios de fácil acceso que faciliten la demostración experimental de una hipótesis sobre la fisiopatología de la enfermedad mucho tiempo después de la obtención de la muestra (Dom & Purri, 2016), en paralelo a la evolución del conocimiento científico y de las técnicas analíticas.

1.3.1. Centros de Recursos Biológicos

Según la resolución de 2011 de la OCDE, los Centros de Recursos Biológicos (CRB) se consideran una parte esencial de la infraestructura sobre la que descansa la biotecnología y la investigación biomédica, proveyendo servicios y repositorios de distintos formatos de material biológico que incluyen células vivas, genomas de organismos e información relacionada con la herencia y funciones de los sistemas biológicos. Los CRB deben cumplir con los altos estándares de calidad exigidos por la comunidad internacional de científicos para la entrega de información y materiales biológicos, y deben proporcionar el acceso a los recursos biológicos de los cuales dependen los estudios de investigación (ORGANIZACIÓN PARA LA COOPERACIÓN Y EL DESARROLLO ECONÓMICOS, 2011).

1.3.2. Biobancos

En la actualidad, los Biobancos de muestras humanas constituirían un CRB si bien se han definido de un modo más amplio. En el Real Decreto 1716/2011, de 18 de Noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los Biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación Biomédica, se define '**Biobanco con fines de investigación biomédica**' como un establecimiento público o privado, sin ánimo de lucro, que acoge una o varias colecciones de muestras biológicas de origen humano con fines de investigación biomédica, organizadas como una unidad técnica con criterios de calidad, orden y destino, con independencia de que albergue muestras con otras finalidades (BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO, BOE, 2011).

En España, los Biobancos generalmente están adscritos a centros médicos o a universidades. Según una encuesta realizada por el Instituto Roche (2006), más del 80% de los Biobancos españoles de muestras humanas se ubican en hospitales. Nace de esa forma el concepto de *Biobancos hospitalarios orientados a enfermedades*.

Este tipo de Biobancos está integrado por colecciones retrospectivas y/o prospectivas de muestras de DNA, tejido, suero, etc. asociadas a datos clínicos y en ocasiones también a ensayos clínicos, y constituyen la base de estudios de biomarcadores de enfermedad. Más en concreto, los Biobancos de tumores representan una fuente para el diagnóstico y la investigación en oncología (Botti *et al.*, 2012), permitiendo tratar el cáncer desde un nuevo enfoque terapéutico.

El **Biobanco del IVO** (BioFIVO) se constituye como un Biobanco de carácter hospitalario orientado a la patología oncológica que da soporte a las distintas necesidades en materia de manejo de muestras biológicas con fines de investigación clínica y translacional, incluidas las que se utilicen en el marco de un ensayo clínico.

Consiste en un repositorio de muestras patológicas, tanto tumorales como peritumorales, de diversos tipos de tumores. Cuenta en la actualidad con más de 200.000 muestras biológicas que se han ido almacenando en condiciones de calidad para su uso en investigación desde 1998. Estas consisten en muestras de tejido excedentes de procesos diagnósticos o terapéuticos, y los tipos son los siguientes: *tejido congelado* (normal y tumoral), *tejido fijado e incluido en parafina* (normal y tumoral), *muestras sanguíneas* (suero, plasma y sedimentos de linfocitos), *orina* (Figura 1), *líquido ascítico*, *DNA* y *RNA*.

El BioFIVO se encuentra adscrito a la Red Valenciana de Biobancos (RVB) y a la Red Europea de Bancos de Tumores (OECI-TuBaFrost), y a su vez es nodo de la Plataforma Nacional de Biobancos regentada por el Instituto de Salud Carlos III. (INSTITUTO VALENCIANO DE ONCOLOGÍA, IVO, 2016).



Figura 1. Muestras de orina almacenadas en el Biobanco del IVO.

1.4. Métodos de almacenamiento

Las muestras tumorales destinadas al almacenamiento conllevan un procesamiento largo en el que se deben tener en cuenta diversos factores para evitar la degradación de la muestra, como el *tiempo de congelación o fijación* de la misma, las *condiciones de almacenamiento*, así como un procesado correcto en los análisis a realizar.

El proceso comienza en el quirófano con la extracción del tejido del paciente. Tras esto, la muestra debe ser inmediatamente enviada a la unidad de Anatomía Patológica en un recipiente estéril cerrado sin sobrepasar un rango de tiempo de 30 minutos. Aquí, un patólogo se encarga de evaluar la muestra y determinar sus características: contenido de tejido tumoral, presencia de isquemia, necrosis, etc. Estas piezas quirúrgicas deben ser representativas del tumor para evitar comprometer el diagnóstico o los estudios de investigación que se realicen en un futuro sobre las mismas (Figura 2).

1.4.1. Congelación

Las muestras de tejido en fresco congelado son de gran valor a la hora de realizar estudios de investigación, más en concreto estudios genómicos o proteómicos. La congelación se considera un buen método de preservación de características moleculares, ya que en el proceso no se emplea ninguna sustancia química que pueda alterar las estructuras. Su objetivo es detener reversiblemente el metabolismo celular mediante el descenso de la temperatura preservando la integridad del tejido.

A lo largo de los años, los métodos de congelación han variado intentando mejorar la preservación tisular, y poder así mermar los posibles inconvenientes que presenta llevar el tejido a temperaturas tan bajas (hasta -196°C).

Existen, pues, diversos modos de congelar la muestra:

1.4.1.1. Nitrógeno líquido

La congelación mediante inmersión directa en nitrógeno líquido es un método de congelación rápida donde la muestra se sumerge directamente en un recipiente que contiene el nitrógeno, y es posteriormente almacenada en ultracongeladores a -80°C .

Esta congelación instantánea ralentiza la acción de proteasas y nucleasas responsables de la degradación de las proteínas y de los ácidos nucleicos; sin embargo, existe el riesgo de que se formen cristales en el proceso, lo que dañaría la estructura tisular, sobre todo si no se emplea ningún agente crioprotector.

1.4.1.2. Isopentano

Recientemente se ha comenzado a emplear el isopentano frío como medio de congelación.

El isopentano viene siendo estudiado desde 1936, cuando Hoerr propuso enfriar los tejidos introduciéndolos en isopentano enfriado previamente con nitrógeno líquido. La temperatura que alcanza este compuesto enfriado es de $-100/-110^{\circ}\text{C}$, por lo que una inmersión previa al nitrógeno líquido permite que la bajada de temperatura sea menos brusca, protegiendo el tejido de la formación de cristales.

1.4.1.3. O.C.T.TM

El compuesto O.C.T.TM (*Optimal Cutting Temperature*) es una solución cuya función es cubrir y proteger la muestra de tejido en el proceso de congelación, y permitir el corte de tejido en frío en el criostato. Su composición es la siguiente: $<11\%$ de polivinil alcohol, $<5\%$ de polietileno glicol, y $>85\%$ de ingredientes no reactivos (resinas).

Las muestras de tejido sólido que van a congelarse se colocan en criomoldes de plástico en un medio criosolidificante, OCT (*Optimal Cutting Temperature*), y se realiza una congelación rápida como se detalla a continuación. Se deposita sobre el criomolde un lecho de OCT; posteriormente se coloca el tejido a criopreservar y finalmente se cubre la totalidad del criomolde con OCT; la congelación se realiza mediante inmersión del criomolde que contiene el tejido en un recipiente metálico con isopentano previamente enfriado a -110°C , almacenándose finalmente las muestras en congeladores de -80°C durante un tiempo indefinido.

1.4.2. Fijación en formalina e inclusión en parafina

La fijación en formalina y la inclusión en parafina es el método más usado para el procesamiento y almacenamiento a largo plazo de muestras de tejido.

El principal objetivo de la fijación es conservar la estructura de los ácidos nucleicos y de las proteínas, es decir, la morfología del tejido. La formalina es una solución acuosa de formaldehído cuyo mecanismo de acción no está todavía bien definido, aunque se sabe que actúa modificando químicamente las biomoléculas y formando entrecruzamientos entre las proteínas y los ácidos nucleicos (Masuda *et al.*, 1999). Tras la fijación en formalina, se procede a la deshidratación del tejido con lavados con alcohol y la inclusión en parafina, almacenándose el correspondiente bloque a temperatura ambiente.

El proceso de fijación ayuda a preservar las proteínas celulares y mantener la estructura tisular, pero reduce la recuperación y la calidad de los ácidos nucleicos, pues es responsable de su fragmentación.

En este proceso, existen diversos factores preanalíticos que pueden tener una influencia en los resultados posteriores, como el tiempo de fijación de la muestra, el tipo de fijativo, el tamaño de la muestra y las condiciones de almacenamiento (Zhou *et al.*, 2016).

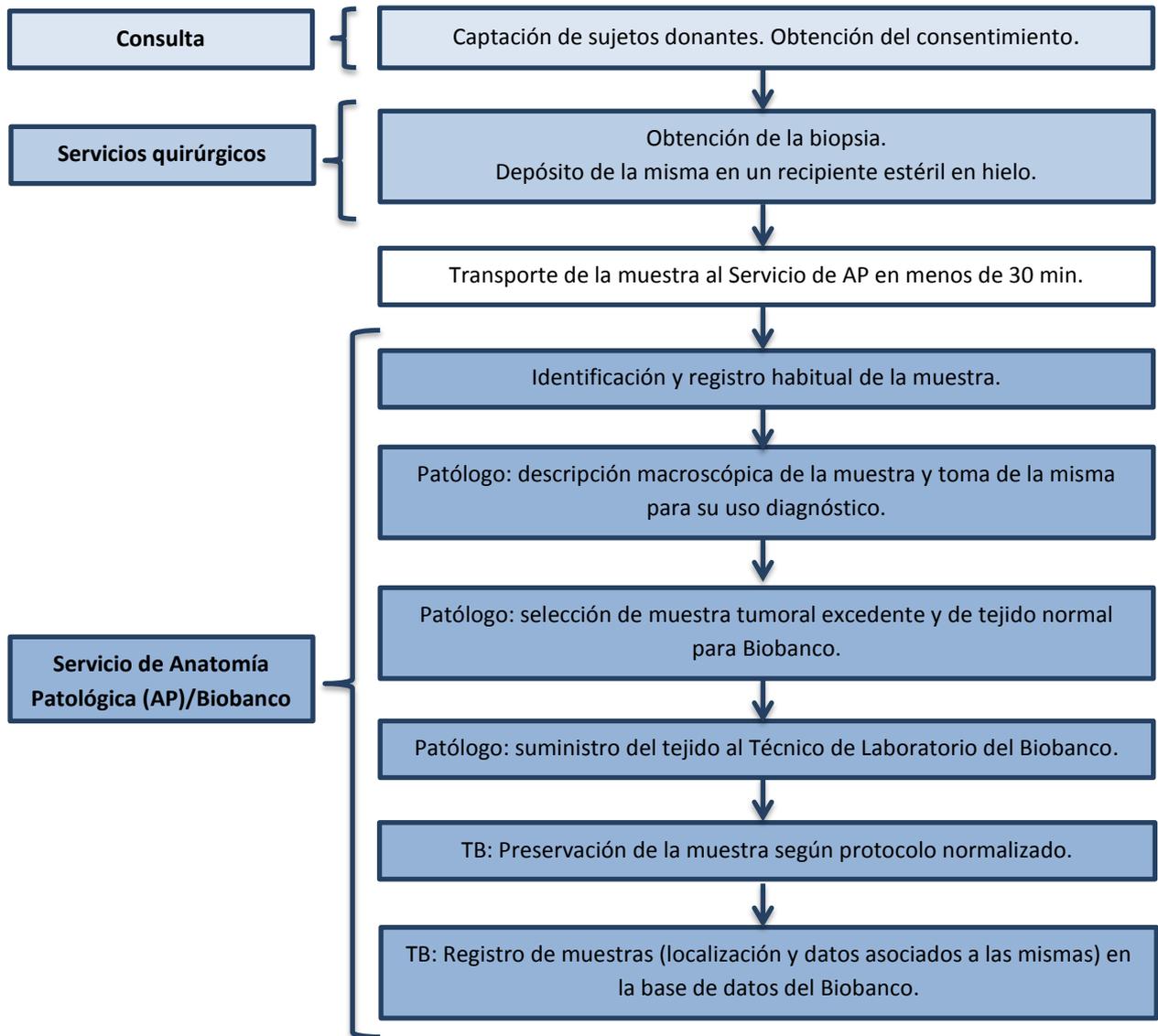


Figura 2. Diagrama de flujo sobre la recogida de muestras tisulares de un Biobanco. AP: Anatomía Patológica. TB: Técnico de Laboratorio. (Figura adaptada de (Morente *et al.*, 2006)).

1.5. Particular importancia de la calidad del RNA

El RNA juega un papel crucial en la transmisión de la información genética, lo que se conoce como *dogma central de la biología molecular* (Figura 3). Este dogma postula que el DNA se transcribe a RNA, que será exportado al citoplasma como mRNA y traducido a proteínas que en definitiva definen el fenotipo de los organismos.

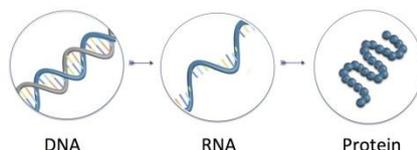


Figura 3. Dogma Central de la Biología Molecular. (Fuente: *Community Science Series: The Central Dogma of Biology.*)

El auge de la biología molecular, incluyendo el desarrollo de tecnologías basadas en la determinación de la expresión de genes individuales, hace necesaria la disponibilidad de un material genético de alta calidad, puesto que la calidad de los resultados será siempre directamente proporcional a la del material del que se parte. La precisión en la evaluación de la expresión génica depende, en un alto grado, del RNA de partida.

Sin embargo, la degradación de estos ácidos nucleicos es un proceso que puede ocurrir debido a un procesamiento inadecuado de la muestra en cuestión, un almacenamiento prolongado de la misma, condiciones de almacenamiento no óptimas, presencia de inhibidores, errónea extracción, y otros tantos factores a tener en cuenta. La presencia de enzimas RNasas también influye fuertemente en la estabilidad de esta molécula; para vencer a este tipo de enzimas se debe trabajar con material libre de RNasas, con guantes en todo momento, y en frío, pues el RNA se considera una molécula muy lábil a los cambios de temperatura.

Por ende, un método standard mediante el cual definir la calidad del RNA previamente a la realización de estudios cobra importancia.

1.5.1. Extracción del RNA

La calidad del RNA es variable y, después de la extracción tras un largo tiempo de almacenamiento, inestable; debido a este hecho, para evitar la degradación, el proceso de extracción del RNA debe seguir los siguientes criterios:

- Libre de proteínas
- Libre de DNA genómico
- Libre de inhibidores enzimáticos para la reacción de PCR
- Libre de nucleasas

La extracción, por tanto, se convierte en un paso crítico a realizar para que el RNA que se consiga recuperar sea de la mayor calidad posible. Esto es esencial en el campo del diagnóstico y el pronóstico, así como también en las conclusiones que derivan de los proyectos de investigación (Vermeulen *et al.*, 2011).

En 1986, Chomczynski y Sacchi desarrollaron el método '*single-step*' para la extracción de RNA. Consiste en el aislamiento de esta molécula a partir de una sola extracción empleando una solución ácida compuesta de tiocianato de guanidinio, fenol y cloroformo. Este novedoso método permitía una rápida extracción (menos de 4 h), obteniendo una gran cantidad y calidad de RNA y siendo posible el procesamiento simultáneo de una gran cantidad de muestras. Cabe destacar, también, que la extracción de RNA se podía realizar con cantidades mínimas de tejido, siendo este hecho de gran importancia cuando sólo se disponía de material biológico limitado (Chomczynski & Sacchi, 1987). El tiocianato de guanidinio es uno de los compuestos desnaturizantes de proteínas más efectivos (se considera un agente caotrópico) y además evita que actúen las enzimas RNasas y DNasas durante el proceso de extracción.

Este método '*single-step*' consiste en añadir en primer lugar el tiocianato de guanidinio para homogeneizar el tejido, y posteriormente añadir el fenol y el cloroformo. Tras centrifugar, se obtiene una fase acuosa, donde se encuentra el RNA, y una interfase y una fase orgánica, en las que residen el DNA y las proteínas. Se recoge la fase acuosa y se precipita el RNA con isopropanol, quedando así disponible para su uso en diversas aplicaciones. Debido al uso del tiocianato, durante todo el proceso de extracción las ribonucleasas están inhibidas, manteniendo así protegido al RNA de la posible degradación.

Veinte años más tarde, en el 2006, ambos científicos reeditaron el protocolo original. Antes, el RNA obtenido era usado en análisis de *Northern Blot*. Sin embargo, con el paso de los años, han ido apareciendo nuevas aplicaciones como la RT-PCR cuantitativa y los estudios de expresión. Para este nuevo tipo de aplicaciones, se requiere la eliminación de las pequeñas trazas de DNA que estén presentes en las muestras, lo que se consigue con la incorporación al protocolo del tratamiento con DNAsa. (Chomczynski & Sacchi, 2006).

Tejido en fresco

Actualmente, y más en concreto para la extracción de tejido en fresco congelado, se emplea el Trizol®.

Este es un reactivo diseñado para aislar RNA de alta calidad a partir de células y muestras de tejido, ya sean de origen humano o de origen animal, vegetal o bacteriológico. Se trata de una solución monofásica que aúna el isocianato de guanidinio, el fenol y otros componentes que facilitan el aislamiento de una gran variedad de moléculas de RNA. Este reactivo mantiene la integridad del RNA debido a la inhibición altamente efectiva de la actividad RNasa mientras se lisan las células y se disuelven los componentes celulares durante la homogeneización de la muestra. (Lan *et al.*, 2009).

Tejido fijado e incluido en parafina

En cuanto al tejido fijado e incluido en parafina se refiere, no existe en la actualidad un método estandarizado en cuanto al análisis y manipulación de este tipo de muestras para futuros estudios. Con el objetivo de estandarizar los procedimientos de extracción de ácidos nucleicos, se realizó un estudio en el que se aisló RNA a partir de muestras FFPE de diferentes tejidos con los métodos propios de 13 laboratorios europeos. Los protocolos de extracción se dividieron en 3 grupos y, tras aplicarlos, se midió la cantidad de RNA que se había

conseguido extraer, y se determinó la calidad del mismo mediante medidas de absorbancia usando espectrofotometría (A_{260}/A_{280}) y métodos de amplificación por PCR.

Según los resultados obtenidos, la mayor cantidad de RNA se obtuvo con kits comerciales basados en la purificación por columnas de sílice y, junto con un tiempo prolongado de digestión por parte de la proteasa-K, se obtuvo el mejor rendimiento en relación a la calidad de RNA (Bonin *et al.*, 2010).

Debido a los estudios realizados, la extracción de material genético a partir de este tipo de tejidos se centra en la actualidad en el uso de columnas de purificación y un tiempo prolongado de la muestra con la proteasa.

1.5.2. Determinación de la calidad

1.5.2.1. Pureza

Para evaluar si una muestra de RNA es pura o bien está contaminada, se emplea la espectrofotometría.

La espectrofotometría es un método sencillo, accesible y útil que se basa en la relación existente entre la absorción de luz de un determinado compuesto y su concentración.

El fundamento es el siguiente: las moléculas tienen la capacidad de absorber radiaciones, entre ellas las radiaciones dentro del espectro UV-visible. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber dependen de la estructura atómica, permitiendo así el estudio a nivel bioquímico de cualquier molécula. Por tanto, como la absorbancia (cantidad de luz absorbida) es una función lineal de la concentración, se puede calcular también fácilmente la cantidad de la molécula existente en la muestra.

Una sustancia absorbe una cantidad de radiación distinta a la que absorbe otro compuesto, por lo que cada molécula tiene un espectro de absorción característico, que consiste en una curva que muestra la cantidad de energía absorbida (absorbancia) en cada longitud de onda del espectro electromagnético.

Los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas, concretamente tienen un máximo de absorción a una longitud de onda de 260 nm (Figura 4). Cuentan, por tanto, con un espectro de absorción característico.

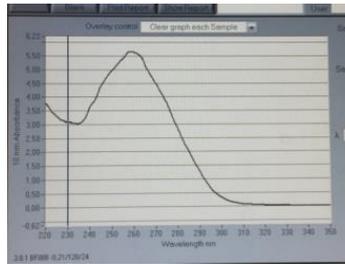


Figura 4. Espectro de absorción típico de los ácidos nucleicos.

La determinación de la pureza se realiza mediante el uso de un espectrofotómetro como el NanoDrop® (Thermo Scientific®), en el que se hace pasar una luz por la solución permitiendo medir la absorbancia de la misma. A una longitud de onda de 260 nm absorben los ácidos nucleicos, y a 280 nm absorben las proteínas, principalmente por los residuos de triptófano. A partir de estas dos medidas se obtiene el ratio A_{260}/A_{280} , que informa de una posible contaminación de la muestra con proteínas.

En el caso del RNA, se establece que una relación A_{260}/A_{280} con un valor de 1,8 o superior se corresponde con un RNA puro, sin ningún tipo de contaminación por parte de proteínas o de cualquier otro tipo de molécula, como los fenoles; valores menores a 1,8 se corresponderán con una muestra contaminada con proteínas. También se puede medir el ratio A_{260}/A_{230} : en este caso, a la longitud de onda de 230 nm absorben las sales caotrópicas y los hidratos de carbono, indicando pureza óptima un ratio de entre 2 y 2,2. No obstante, este ratio no se suele utilizar, ya que en el caso de que se trabaje con muestras diluidas con algún tampón, el ratio A_{260}/A_{280} no cambia, porque el contenido en proteínas es el mismo, pero sí lo hace el ratio A_{260}/A_{230} por la mayor presencia de sales, por lo que no es un excelente indicador de la pureza.

El uso de este espectrofotómetro presenta diversas ventajas, entre ellas el empleo de una pequeña cantidad de muestra (1,5 μ l), la sencillez del método, y que permite confirmar que se cuenta con suficiente cantidad y calidad de material de partida para los ensayos posteriores a realizar, como una PCR cuantitativa o una secuenciación masiva.

1.5.2.2. Concentración

Para determinar la concentración de RNA se ha recurrido a lo largo de los años a la cuantificación por espectrofotometría.

La cuantificación de ácidos nucleicos por espectrofotometría ha sido ampliamente utilizada, pues permite mediciones en un amplio rango de concentración, evitando la necesidad de realizar diluciones. Sin embargo, no es un método completamente específico, pues puede medir nucleótidos que se encuentren dispersos o incluso hebras de DNA, ya que no se debe olvidar que las medidas espectrofotométricas no diferencian entre DNA y RNA, sobreestimando de esta forma la cantidad de RNA presente en la muestra.

Por su parte, la fluorometría se basa en la detección y medición por fluorescencia del RNA que ha sido previamente marcado con un agente fluorescente. Este reactivo se une de manera específica a la simple hebra de RNA y, tras un período corto de incubación, es capaz de otorgar una señal de fluorescencia que será captada por el equipo. De esta forma, la doble

hebra de DNA no puede interferir en la cuantificación final, a diferencia del método espectrofotométrico, por lo que se considera un ensayo más preciso y eficiente.

En base a lo anteriormente expuesto, si se requiere obtener concentraciones muy exactas, la cuantificación espectrofotométrica debe suponer sólo una medida de referencia, pero no el único método de determinación de la concentración, siendo necesario recurrir a métodos fluorométricos.

En diversos estudios se ha podido demostrar que las mismas muestras cuantificadas usando diferentes métodos muestran, efectivamente, resultados desiguales. Es por ello que, cualquiera que sea el método de cuantificación elegido, es de crítica importancia usar el mismo sistema para todas las muestras incluidas en un estudio (Nolan & Bustin, 2008).

1.5.2.3. Integridad

El método más empleado para evaluar la integridad del RNA ha sido, por excelencia, la electroforesis en gel de agarosa, que permite evaluar la proporción de las bandas ribosomales (Figura 5).

El RNA se puede catalogar como íntegro si se observan dos bandas correspondientes a los RNA ribosomales 28S y 18S en la parte baja del gel, y si la proporción 28:18S es de 2. Sin embargo, este de alta calidad es difícil de conseguir, esencialmente en RNA derivado de muestras clínicas, y está sujeto a la interpretación del investigador, no siendo lo suficientemente preciso (Copois *et al.*, 2007). Además, con este método se consume una gran cantidad de muestra (0,5 – 2 µg), lo que supone un inconveniente cuando se dispone de muy poco material de partida.

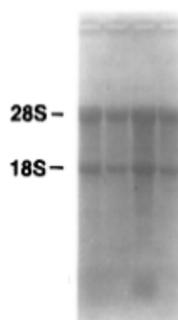


Figura 5. Ejemplo de bandas ribosomales en gel de agarosa. (Fuente: Chomczynski & Sacchi, 1987).

Debido a que este método convencional no resulta lo suficientemente sensible, ha surgido la necesidad de desarrollar un sistema automatizado que permita estandarizar la evaluación de la integridad del RNA otorgando unos valores numéricos, permitiendo de esta forma una comparación más acertada entre experimentos.

Actualmente, la electroforesis microfluídica capilar ha supuesto toda una revolución en cuanto a la evaluación de la integridad del RNA se refiere.

La tecnología microfluídica es un sistema automatizado en el que las muestras de RNA son separadas dependiendo de su peso molecular, y detectadas vía laser. Este tipo de electroforesis genera un electroferograma propio de cada molécula de RNA (Figura 6) en el cual se visualizan diversas características propias de la misma.

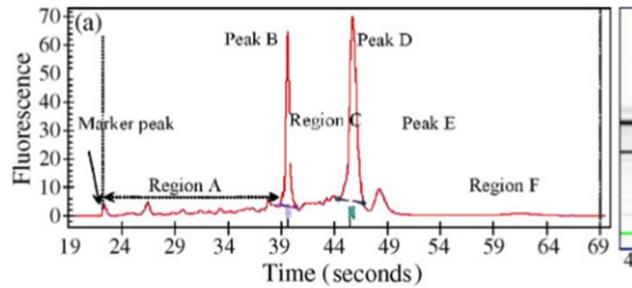


Figura 6. Cromatograma realizado con electroforesis microcapilar.

En la figura 6 se pueden observar diferentes regiones en el propio electroferograma: la región A representa RNA de bajo peso molecular; el pico B es el RNA ribosomal 18S, cuyo peso varía según el nivel de degradación del RNA; la región C representa la región entre el pico de 18S y el de 28S (pico D), cuya longitud incrementa en el caso de que el RNA esté degradado. El pico E representa el precursor nuclear del RNA, y por último, la región F se corresponde con el RNA de alto peso molecular.

El electroferograma, por tanto, es capaz de otorgar mucha más información del estado de degradación de la molécula de RNA que simplemente el ratio 28S:18S que se consigue visualizando el gel de agarosa. Este nuevo método ha desplazado a la electroforesis en gel, pues cuenta con más ventajas, como el empleo de una cantidad mínima de RNA (esencial en muestras patológicas valiosas), la capacidad de poder analizar un gran número de muestras a la vez (hasta 96), y la posibilidad de proporcionar lo que se conoce como RIN (*RNA Integrity Number*).

El RIN constituye una nueva herramienta para determinar la integridad del RNA, y consiste en un valor que permite clasificar las muestras en un sistema numérico del 1 al 10: 1 para las muestras completamente degradadas y 10 para el RNA intacto. Este número se determina a partir de la forma del electroferograma (Figura 7) por lo que se tienen en cuenta muchas más características de la molécula que pueden dar una mejor idea acerca de la integridad de la misma.

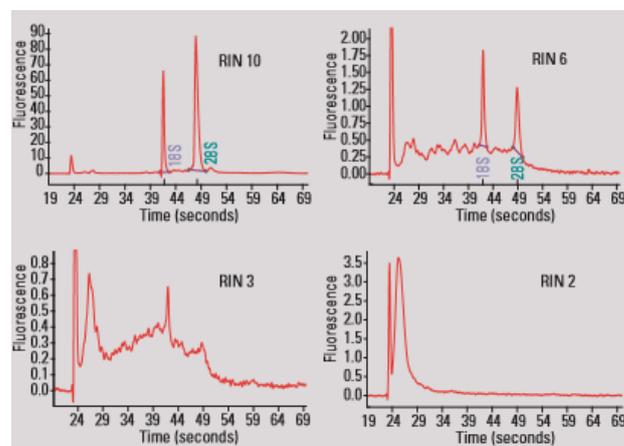


Figura 7. Cromatogramas de electroforesis microcapilar de muestras con diferentes RIN, por tanto, diferentes niveles de degradación. (Fuente: Mueller & Schroeder, 2004).

La degradación del RNA se puede observar en el electroferograma como un incremento de fragmentos pequeños, visible en la primera parte de la gráfica, así como en una disminución de la intensidad de señal de los RNA ribosomales (Schroeder *et al.*, 2006).

Gracias a la creación del algoritmo RIN ha sido posible el desarrollo de un sistema automatizado y fiable, por lo que la comparación de muestras se torna mucho más sencilla que con el antiguo método ya que la interpretación visual del investigador queda relegada a un software. De este modo, la estandarización en cuanto a la evaluación de la integridad de estos ácidos nucleicos facilita el intercambio de información entre la comunidad científica.

1.5.2.4. Funcionalidad

Tradicionalmente, para evaluar la funcionalidad del RNA, se estudiaba la expresión del mRNA de los genes en cuestión a partir de una PCR cuantitativa a tiempo real de transcripción reversa (RTq-PCR).

Sin embargo, se podían producir errores en la cuantificación de estos transcritos que dependían, por ejemplo, del material de partida (si éste estaba degradado o no contaba con la suficiente calidad, los resultados podrían no ser totalmente representativos). Debido a ello, la cuantificación de la actividad de cada gen se pasó a normalizar con unos genes de referencia (de Cremoux *et al.*, 2004). Esta cuantificación relativa permite corregir los resultados obtenidos introduciendo un control endógeno cuya funcionalidad es ya conocida.

Es por ello que la calidad del material de partida resulta crucial a la hora de efectuar una PCR. Concretamente, el efecto del RIN de una muestra en la qPCR fue investigado en un estudio en el que se relacionaban los valores del RIN con los Ct (*Cycle Threshold*) o Cp (*Crossing Points*) de la PCR (Fleige & Pfaffl, 2006). La importancia de emplear un RNA de alta calidad se demuestra con los resultados reflejados en la figura 8:

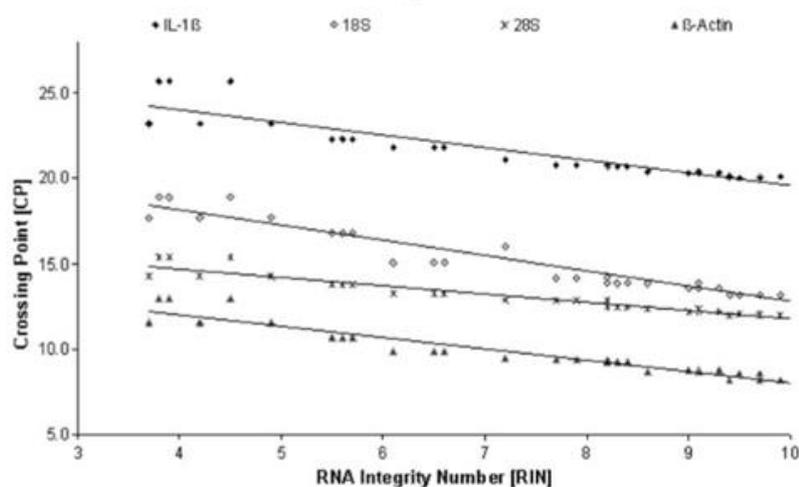


Figura 8. Influencia del RIN en el *Crossing Point* o *Cycle Threshold*. (Fuente: Fleige & Pfaffl, 2006).

Un incremento en el RIN de la muestra se corresponde con un Ct menor, lo que se traduce en una mejor eficiencia de la PCR. Que se consiga alcanzar el umbral de fluorescencia en menor tiempo es sinónimo de mayor integridad del RNA, pues sobre un RNA fragmentado no podrá trabajar la polimerasa ni los diferentes componentes que participan en la reacción. Además, se trata de un RNA funcional, pues el Ct se alcanza antes, sinónimo de que la reacción se está llevando a cabo a una velocidad mayor.

No obstante, un RNA intacto no puede garantizar buenos resultados en la PCR, pues se puede dar una situación en la que la muestra contenga inhibidores que reduzcan la eficiencia de esta reacción.

Estos inhibidores resultan en una reducción significativa de la sensibilidad y la cinética de la PCR. Pueden tratarse de reactivos usados durante la extracción de los ácidos nucleicos, o componentes de la propia muestra biológica, como pueden ser sales, urea, heparina o IgG.

La metodología empleada para la detección de tales inhibidores consiste en amplificar un gen de referencia en paralelo al gen en estudio y relacionar sus cuantificaciones. Sin embargo, este enfoque asume que ambos genes están inhibidos al mismo nivel, por lo que se desarrolló una nueva técnica para valorar la presencia de tales inhibidores, conocida como técnica SPUD (Gene-Quantification.info, 2016), (Gallup *et al.*, 2012). Este ensayo se basa en identificar inhibidores de la transcripción inversa en la PCR mediante la realización de curvas de amplificación y la medición del término Ct (*Cycle Threshold*).

Para comprobar si existen inhibidores que dificulten la obtención de resultados precisos se realiza una PCR de un amplicón conocido, concretamente del genoma de la patata de 101 pares de bases, con sus dos primers específicos. Se escogió el gen phyB del organismo *Solanum tuberosum* porque codifica un fotorreceptor involucrado en la coloración de la raíz de la patata, por lo que es específico de esta especie y no puede dar lugar a una amplificación en el genoma humano, evitando así posibles errores. A partir de esta amplificación se realiza una curva en la cual se representa el número de ciclos frente a la fluorescencia emitida, obteniendo también el valor del Ct. Tras esto, se procede a realizar la PCR de la muestra del tejido en cuestión junto con el amplicón anteriormente utilizado. Si no existen inhibidores, las dos curvas de amplificación del amplicón (la obtenida en la primera PCR y la obtenida en la segunda realizada junto al target de interés) deben ser iguales y presentar el mismo Ct. Si se observa una diferencia en este valor, significará que existen inhibidores en la muestra de tejido que se está analizando, puesto que a la señal fluorescente del amplicón de la patata le costará más ciclos alcanzar el Ct.

El ensayo SPUD constituye pues una buena herramienta para la identificación de inhibidores, y el sistema puede ser empleado para identificar también falsos negativos en cuanto a la PCR para diagnóstico se refiere (Nolan *et al.*, 2006).

2. OBJETIVOS

Los objetivos a cumplir en el trabajo son los siguientes:

- Valorar la calidad de las muestras del Biobanco del IVO.
- Comparar si el modo de almacenamiento y la antigüedad de la muestra se traduce en una diferencia en la calidad de las muestras.
- Comprobar qué método de almacenamiento (congelado o incluido en parafina) es, por tanto, el más indicado.
- Elaborar un procedimiento normalizado de trabajo para la evaluación de la calidad del RNA de las muestras almacenadas en el BioFIVO para implementarlo en el Sistema de Gestión de Calidad del Biobanco.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestras

Para el estudio se analizaron un total de 100 muestras de diversos años. Se han estudiado 50 casos, y de cada uno de ellos se ha obtenido una muestra de tejido congelado y una muestra de tejido fijado e incluido en parafina. Los datos relativos a la procedencia de las muestras se indican en la tabla 1:

Tabla 1. Muestras empleadas para el estudio.

	Nº de muestras				
	1999	2005	2013	2014	2015
Vejiga	3	3			
Colon	1	2			
Útero			5	5	5
Riñón	6	5	5	5	5

Los 50 casos se agruparon en grupos de 10 en función del año al que pertenecían. Además, el método de congelación ha ido variando a lo largo del tiempo. Esta información se recoge en la siguiente tabla:

Tabla 2. Número de casos y métodos de congelación por años.

Casos	Año	Método de congelación
1-10	1999	Inmersión en N ₂ líquido
11-20	2005	Inmersión en N ₂ líquido
21-30	2013	Isopentano + N ₂ líquido
31-40	2014	Isopentano + N ₂ líquido
41-50	2015	O.C.T™

Estas muestras se obtuvieron del Biobanco del IVO con previa aprobación del Comité de Ética adscrito al mismo.

3.2. Extracción de RNA

3.2.1. Tejido en fresco

Para proceder a la extracción del RNA a partir de tejido en fresco, se empleó el kit comercial *PureLink™ RNA Mini Kit* (Invitrogen®).

En primer lugar se procedió a la homogeneización del tejido. Para ello, se descongelaron las muestras y se colocaron en una placa Petri, cortándolas en pequeños trozos. Se les añadió el

Trizol, que aísla el RNA manteniendo su integridad, y se metió la mezcla al homogeneizador de tejidos. Tras esto, se procedió a la extracción de RNA añadiendo cloroformo, centrifugando, y obteniendo la fase superior acuosa. Posteriormente se añadió etanol y se llevó a cabo la purificación por columnas, lavando con los buffers y resuspendiendo el RNA final en agua miliQ para su uso en las aplicaciones posteriores. El protocolo a seguir, con más detalle, es el siguiente:

1. Descongelar muestra.
2. Añadir 1 ml de Trizol.
3. Meter la muestra y el Trizol al homogeneizador de tejidos.
4. Incubar el lisado 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Añadir 200 μ l de cloroformo por cada ml de Trizol añadido.
6. Agitar los tubos vigorosamente a mano durante 15 segundos (no vortear).
7. Incubar 20 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar 20 minutos a 12000xg a 4°C.
9. El homogeneizado se separa en una fase acuosa en la parte superior que contiene el RNA, una interfase, y una fase orgánica en la parte inferior del tubo, conteniente el DNA y las proteínas. Transferir la fase acuosa transparente superior (600 μ l aprox.) a un tubo limpio.
10. Añadir un volumen de etanol al 70% (600 μ l) y vortear. Dispersar cualquier precipitado visible tras añadir el etanol.
11. Transferir 700 μ l de la muestra a una columna, centrifugar a 12000xg 30 segundos a temperatura ambiente. Descartar el líquido que queda en el fondo del tubo.
12. Repetir el paso 11 hasta pasar todo el contenido de la columna.
13. Añadir 700 μ l de Wash Buffer I a la columna.
14. Centrifugar a 12000xg 15 segundos a temperatura ambiente. Descartar el tubo colector.
15. Poner la columna en un tubo de lavado de RNA (incluido en el kit).
16. Añadir 500 μ l de Wash Buffer II a la columna.
17. Centrifugar a 12000xg 15 segundos a temperatura ambiente. Descartar el líquido que queda en el fondo del tubo.
18. Centrifugar la columna vacía a 12000xg 1 minuto a temperatura ambiente para eliminar el buffer remanente.
19. Repetir los pasos 16-18. Descartar el tubo de lavado.
20. Poner la columna en un RNA Recovery Tube (incluido en el kit).
21. Añadir 35 μ l de Agua libre de RNasas al centro de la columna.
22. Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
23. Centrifugar la columna 3 minutos a máxima velocidad.
24. Repetir los pasos 21-23.
25. Recoger el eluido final.

3.2.2. Tejido fijado e incluido en parafina

Para la extracción del RNA procedente de las muestras FFPE se empleó el kit comercial *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE* (Ambion®).

En este procedimiento se realiza inicialmente una desparafinación inicial mediante lavados con xilol y etanol, para de este modo eliminar la parafina del tejido y evitar que interfiera durante el proceso de extracción y posteriores. Tras ello, se realiza una digestión con proteinasa K, una segunda digestión con DNasa y una serie de lavados con un eluido final en agua. Durante el proceso de purificación del RNA, éste permanece retenido en un filtro de fibra de vidrio incluido en una columna. A continuación se detalla paso por paso el protocolo empleado:

1. Se colocan 3 cortes de 10 µm en un tubo Eppendorf estéril.
2. Se añaden 1000 µl de xilol. Se vortea vigorosamente e incuba 3 min. a 50°C.
3. Se centrifuga a máxima velocidad (13.400 rpm) durante 2 min. a temperatura ambiente.
4. El sobrenadante se descarta con pipeta sin tocar el pellet.
5. Se repiten los pasos 2-4.
6. Se añaden 1000 µl de etanol 100% para eliminar el xilol. Se vortea la muestra.
7. Se centrifuga a máxima velocidad durante 2 min. a temperatura ambiente.
8. Se desecha la pipeta con el etanol.
9. Se repiten los pasos 6-8.
10. Una vez desechado el etanol, se coloca el tubo Eppendorf en una estufa a 37°C con la tapa abierta a fin de conseguir la completa evaporación del etanol.
11. Tras esto, el pellet se resuspende en 400 µl de Tampón Proteasa (Digestion Buffer).
12. Se añaden 4 µl de Proteasa (almacenada a -20°C), se vortea y se incuba a 50°C durante 3 h., vorteaando ocasionalmente.
13. A continuación, se añaden 480 µl de Isolation Additive y se vortea.
14. Se añaden 1000 µl de etanol 100% y se mezcla bien con la pipeta.
15. Se monta la columna de extracción en un tubo de recogida presente en el kit y se pasan 700 µl de la mezcla y se centrifuga durante 1 min. a 10.000 rpm, desechando el líquido que queda en el tubo.
16. Se repite el paso 15 hasta haber pasado toda la solución.
17. El filtro de la columna se lava con 700 µl de la solución Wash 1 y centrifugando a 10.000 rpm durante 1 min.
18. Tras la centrifugación se descarta el líquido.
19. Se lava con 500 µl de la solución Wash 2/3 y se centrifuga a 10.000 rpm durante 1 min., desechando el líquido que queda en el tubo.
20. Se efectúa un spin de 30 seg., para acabar de secar la columna.
21. Se prepara el Mix para la digestión enzimática con DNasa:
 - 4 µl de DNasa
 - 6 µl de 10x DNasa buffer
 - 50 µl de agua libre de DNasas
22. Se añaden los 60 µl del Mix a la columna y se incuba 30 min. a temperatura ambiente.
23. Se lava con 700 µl con el Wash 1 y se incuba durante 1 min. a temperatura ambiente.
24. Se centrifuga 1 min. a 10.000 rpm y se desecha el líquido.

25. A continuación se lava con 500 µl de Wash 2/3 y se centrifuga 1 min. a 10.000 rpm, desechando el líquido.
26. Se repite el paso 25.
27. La columna se pasa a un tubo colector limpio y se añaden 35 µl de agua libre de RNAsas.
28. Se incuba 10 min. a temperatura ambiente.
29. Tras la incubación, se centrifuga a máxima velocidad durante 1 min.
30. Se repite la elución con otros 35 µl (que harían un volumen total de elución de 70 µl).

3.3. Determinación de la calidad

3.3.1. Ratios de absorbancia

El ratio A_{260}/A_{280} que indica la contaminación de una muestra de RNA se obtuvo con el espectrofotómetro NanoDrop®.

En primer lugar se colocaron 1,5 µl de agua miliQ en el espectrofotómetro para realizar el blanco. A continuación, se añadieron 1,5 µl de cada muestra para, con la ayuda del programa informático que tiene asociado el NanoDrop®, obtener los datos de pureza. Para finalizar, tras la última muestra, se realizó la medición de otro blanco para asegurar que no quedan ácidos nucleicos en el aparato.

3.3.2. Cuantificación

Para cuantificar el contenido de RNA total de la muestra por métodos espectrofotométricos de la muestra se empleó el espectrofotómetro NanoDrop 1000®.

Por otra parte, la cuantificación por métodos fluorométricos se realizó con el fluorómetro Qubit® 2.0 (Invitrogen™) empleando el kit *RNA HS Assay* (Molecular Probes®), que incluye el reactivo que se une al RNA y que emite fluorescencia, un *buffer* de dilución, y unos *standards* de RNA para poder realizar una recta de calibración.

Teniendo en cuenta que el kit es preciso cuanto trabaja con una concentración de la muestra de unos 100 ng/µl, dependiendo de las concentraciones obtenidas usando el espectrofotómetro se realizaron diluciones para conseguir esta concentración final.

Se realizó primeramente la dilución del reactivo fluorescente con el *buffer* (1:200) teniendo en cuenta el número de muestras a analizar y los dos *standards*. Tras ello, se realizó un vórtex para que el reactivo fluorescente estuviera presente en toda la solución. Para los *standards*, se añadieron 190 µl de la dilución y 10 µl de cada *standard* (la concentración del *standard* 1 es de 0 ng/µl, y la del *standard* 2, de 10 ng/µl), y para las muestras, 199 µl de reactivo y 1 µl de la dilución realizada. Se dejaron todos los tubos incubando durante 2 minutos, y se procedió a la cuantificación.

3.3.3. RT-qPCR

Para determinar la funcionalidad del RNA, en primer lugar se realizó una RT-PCR para retrotranscribir el RNA a cDNA, y, tras ello, una PCR cuantitativa (qPCR) con el cDNA como molde.

PCR de transcripción inversa

En el caso de la PCR de transcripción inversa, se empleó el kit *High-Capacity cDNA* (Invitrogen™). Es un proceso en el que, empleando una polimerasa de origen retroviral, la denominada transcriptasa inversa, se sintetiza cDNA a partir de un molde de RNA. Este kit cuenta con hexámeros que se unen al mRNA molde en distintos sitios y que actúan como primers para producir una librería de cDNA.

La reacción de RT se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

1. Los reactivos necesarios para la reacción son los detallados en la Tabla 3:

Tabla 3. Composición de la mezcla de reacción de la RT.

Componentes reacción	Volumen por reacción (μl)
RT Buffer 10x	5
RT <i>Random</i> Primers 10x	5
dNTP mix (100mM)	2
Inhibidor de la RNasa (20 U/μl)	2,5
Retrotranscriptasa (50 U/μl)	2,5
H ₂ O	-
RNA (12 ng/μl)	-
Volumen final de reacción	50

2. La mezcla de reacción se preparó multiplicando el volumen de una unidad de reacción por el número de casos con los que se procedía a realizar la PCR y se añadió un 10% adicional para compensar posibles errores al pipetear.
3. Tras la preparación de la mezcla de reacción, se vorteo el tubo para que los componentes se homogeneizaran.
4. Se dispuso el volumen final correspondiente a cada tubo de reacción.
5. En último lugar, se añadió el volumen correspondiente de RNA (equivalente a 600 ng de RNA total) a cada tubo de reacción, salvo al blanco, al que se añadió un volumen equivalente de agua.
6. Los tubos de reacción se colocaron en el termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems™), y se ejecutó el programa recogido en la Tabla 4:

Tabla 4. Programa de temperaturas para la retrotranscripción.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)
25	10
37	120
85	5
4	∞

PCR cuantitativa a tiempo real

El segundo paso es emplear el cDNA molde obtenido en la retrotranscripción para realizar una PCR cuantitativa. Se empleó el kit *TaqMan® Fast Universal Master Mix* (Applied Biosystems™).

Este método se caracteriza por realizar una cuantificación a tiempo real de la amplificación de un gen en concreto (en este caso, microglobulina y GAPDH). En la reacción se añaden unas sondas (sondas *TaqMan®*) y una Taq polimerasa con actividad 5'-3' exonucleasa. Las sondas *TaqMan®* consisten en un oligonucleótido de 18 a 22 pares de bases diseñado para hibridar en el centro de la secuencia amplificada (Figura 9). Este está marcado con una molécula fluorófora (*reporter*) en el extremo 5' y una molécula atenuadora (*quencher*) en el extremo 3'. Ambas actúan por transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), de forma que, cuando están muy próximas, la sonda no emite fluorescencia, pues el inhibidor de fluorescencia (*quencher*) absorbe la fluorescencia emitida por el *reporter*; no obstante, cuando la polimerasa llega al punto en que se encuentra con la sonda, activa su función 5'-3' exonucleasa, degradándola. En este punto, la molécula *reporter* y la *quencher* se separan, lo que resulta en la emisión de fluorescencia por parte del fluoróforo *reporter*.

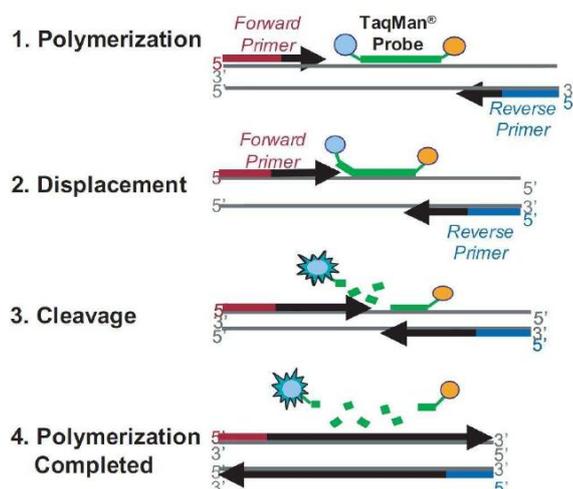


Figura 9. Mecanismo de acción de las sondas *TaqMan®* en la qPCR. (Fuente: Johnson *et al.*, 2015).

El procedimiento a seguir es el siguiente:

1. Los reactivos utilizados se detallan en la tabla 5:

Tabla 5. Composición de la mezcla de reacción de la qPCR.

Componentes reacción	Volumen por reacción (µl)
TaqMan® Universal Master Mix	5
Assay	1
H ₂ O	2
cDNA	2
Volumen final de reacción	10

2. La mezcla de reacción se preparó multiplicando el volumen de unidad de reacción por el número de casos a realizar, y teniendo en cuenta que cada reacción se realiza por triplicado. Además, se tuvo en cuenta las 3 reacciones correspondientes al blanco (sin cDNA).
3. Tras la preparación de la mezcla, se vorteo el tubo.
4. A continuación, se prepara la placa de PCR *MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate* (Applied Biosystems™), añadiendo a cada pocillo 8 µl del mix y 2 µl del cDNA a estudio obtenido en la RT-PCR anterior, a excepción del blanco, en el cual se añadieron 2 µl de H₂O.
5. Por último, se centrifuga la placa y se introduce en el termociclador ABI 7500 Fast (Applied Biosystems™), siguiendo el programa detallado en la tabla 6.
6. Para cada *assay* en cada muestra se obtiene el valor de Ct (*cycle threshold*), que corresponde al ciclo de amplificación en el que se detecta un aumento de la fluorescencia por encima del valor establecido como umbral.

Tabla 6. Programa de temperaturas para la qPCR.

Temperatura (°C)	Tiempo (s.)	Nº de ciclos
95°C	20	40
95°C	3	
60°C	30	

Los *assays* utilizados fueron el gen que codifica para la microglobulina (Ref. Hs99999907_m1) y para la GAPDH (Ref: Hs00266705_g1), ambos del kit *TaqMan® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems™), realizándose las placas de ambos *assays* por separado.

3.3.4. Microelectroforesis capilar

Para llevar a cabo la microelectroforesis capilar, se empleó el Bioanalizador QIAxcel® y el kit *RNA QC v2.0* (Qiagen®). Este equipo utiliza la electroforesis capilar en gel para permitir la rápida separación de los ácidos nucleicos en base a su tamaño. Esta separación, a diferencia de la tradicional electroforesis en gel, se da en un capilar (individual para cada muestra) en el cual, tras la aplicación de un voltaje, se produce la migración del RNA cargado negativamente

hacia el extremo positivo. Un detector colocado en el instrumento detecta los ácidos nucleicos, y los datos son convertidos en un electroferograma.

El protocolo a seguir es el siguiente:

1. Pipetear 1 μ l de la muestra de RNA y 1 μ l de *QX RNA Size Marker* en tubos de 0,2 ml.
2. Añadir 1 volumen de *QX RNA Denaturation Buffer*.
3. Incubar los tubos a 70°C durante 2 min.
4. A continuación, incubarlos en hielo durante 1 min.
5. Centrifugar para recoger cualquier condensación.
6. Añadir *QX RNA Dilution Buffer* hasta alcanzar los 10 μ l de solución.
7. Introducir las muestras en el Bioanalizador y analizar los resultados.

3.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos se llevó a cabo utilizando el programa IBM SPSS Statistics (versión 23).

Para poder comparar la calidad entre las muestras congeladas y las incluidas en parafina, así como entre los diferentes años, se calcularon los estadísticos descriptivos de todos los datos obtenidos, y posteriormente se representaron gráficamente mediante un diagrama de *box-and-whisker*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Extracción y cuantificación

En cuanto a la cuantificación del RNA con el uso de NanoDrop® y de Qubit®, los resultados de estas cuantificaciones se recogen en la Tabla 7:

Tabla 7. Cuantificaciones (en ng/μl) de los 50 casos tanto por método espectrofotométrico (NanoDrop®) como por método fluorométrico (Qubit®).

CASOS	NanoDrop		Qubit		CASOS	NanoDrop		Qubit	
	FRESCO	PARAFINA	FRESCO	PARAFINA		FRESCO	PARAFINA	FRESCO	PARAFINA
1	148,6	79,4	140,58	89,6	26	242,05	54,7	33,16	60
2	291,7	28,7	355,87	19,1	27	498,72	301,7	434,69	248,6
3	1030,1	218,7	1133,11	122,47	28	87,69	73,9	51,8	68,28
4	692	424,8	927,28	240,69	29	593,59	262,2	427,38	201,37
5	247,14	23	162,12	15	30	529,59	289,2	380,25	286,31
6	194,31	96,9	92,88	92,6	31	523,8	287,5	743,8	310,5
7	153,11	37,5	101,05	25,4	32	767,4	191,6	1089,71	191,6
8	35,47	36,3	52	33,6	33	517,35	212,4	327,49	170,77
9	239,29	103,6	140,22	85,99	34	880,77	48,4	836,73	29,6
10	75,2	126,4	58,4	117,8	35	497,68	225,6	346,39	217,93
11	339,8	122,6	448,54	93,18	36	1500,31	173,2	1530,32	140,64
12	1321,8	238,6	1453,98	164,63	37	417,46	140,9	342,42	102,57
13	121,9	358,6	121,66	285,45	38	30,94	103,5	43,3	110
14	567,3	138,6	692,11	107,56	39	172,74	56,7	190	27,3
15	1834,7	333,3	3559,32	205,31	40	1176,11	113,5	1154,94	77,41
16	12,4	102,8	2,48	98,48	41	30,3	19	23,10	19,8
17	25,9	235,3	18,60	193,42	42	96,3	91,1	102	55,6
18	71,5	309,4	81,20	284,65	43	33,2	46,9	34,70	48,4
19	119,5	171,2	112,81	152,37	44	12,7	42,6	2,68	78
20	17,75	113,7	4,44	105,06	45	70,8	412,1	114	398,91
21	1737,4	130	2571,35	104,78	46	10,2	10,4	1,29	2,05
22	651,9	272,8	649,29	191,51	47	36,1	85	28,70	102
23	885,5	290,5	991,76	282,95	48	8,7	50,9	1,43	46
24	6,3	89,6	3,02	101,56	49	9,1	171,5	0,82	136,86
25	756,3	265,6	968,06	167,33	50	13,6	122,3	2,68	108,85

Tras obtener todos los datos, se realizó un estudio estadístico calculando ciertos parámetros (media, desviación estándar, mediana, valor máximo, valor mínimo y *p-value* de los valores de cada año) y así poder comparar mejor entre muestras de tejido en fresco por un lado y fijadas e incluidas en parafina por otro (tablas 8 y 9). Para interpretar las diferencias de manera visual, se procedió a realizar un diagrama *box-and-whisker* (figura 10) en el que quedaban representadas las cuantificaciones de ambos tipos de tejido en el conjunto de años estudiado.

Tabla 8. Valores de cuantificación con NanoDrop® en muestras de tejido en fresco.

Año	Media	N	Desviación Estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>p-value</i>
1999	310,69	10	310,61	216,80	35,47	1030,10	0,019
2005	443,26	10	634,32	120,70	12,40	1834,70	
2013	598,91	10	489,97	561,59	6,30	1737,40	
2014	648,47	10	445,80	520,57	30,94	1500,31	
2015	32,1	10	29,65	21,95	8,70	96,30	
Total	406,68	50	471,85	216,80	6,30	1834,70	

Tabla 9. Valores de cuantificación con Nanodrop® en muestras de tejido fijado e incluido en parafina.

Año	Media	N	Desviación Estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>p-value</i>
1999	117,53	10	123,21266	88,15	23,00	424,80	0,090
2005	212,41	10	96,36324	203,25	102,80	358,60	
2013	203,02	10	102,18288	263,90	54,70	301,70	
2014	155,33	10	76,81496	157,05	48,40	287,50	
2015	105,18	10	118,39959	67,95	10,40	412,10	
Total	158,69	50	109,51150	124,50	10,40	424,80	

En la tabla 8 queda reflejado cómo a medida que pasan los años, el valor de la media va aumentando a excepción del año 2015. Es decir, el rendimiento aumenta con el paso de los años; por tanto, nos encontramos ante un *p-value* menor que 0,05, lo que significa que el paso del tiempo sí que influye significativamente en la cantidad obtenida de RNA. No obstante, en el año 2015 bajan significativamente los valores, por lo que si no se tuviera en cuenta los datos obtenidos con estas muestras, la linealidad sería sin duda indiscutible. En la tabla 9, el *p-value* es mayor que 0,05, por lo que no existen diferencias significativas en las cuantificaciones de los diferentes años.

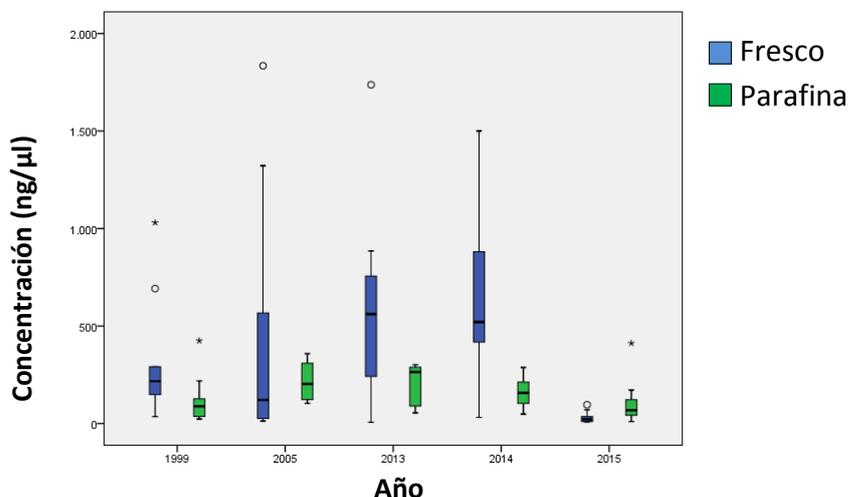


Figura 10. Representación de las diferentes concentraciones (meduradas con NanoDrop®) de RNA que se consiguieron obtener tanto en tejido fresco congelado como en tejido fijado e incluido en parafina a lo largo de los diferentes años.

Los datos estadísticos correspondientes a la cuantificación por Qubit® se recogen en las tablas 10 y 11 y en la figura 11:

Tabla 10. Valores de cuantificación con Qubit® en muestras de tejido en fresco.

Año	Media	N	Desviación Estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>P value</i>
1999	316,35	10	388,77443	140,40	52,00	113,11	0,149
2005	649,5140	10	1119,46561	117,2350	2,48	3559,32	
2013	651,0860	10	762,67684	431,0350	3,02	2571,35	
2014	660,51	10	487,20479	545,0950	43,30	1530,32	
2015	31,14	10	42,53514	12,8900	0,82	114,00	
Total	461,7202	50	688,06993	140,40	0,82	3559,32	

Tabla 11. Valores de cuantificación con Qubit® en muestras de tejido fijado e incluido en parafina.

Año	Media	N	Desviación Estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>P value</i>
1999	84,2250	10	68,49983	87,7950	15,00	240,69	0,100
2005	169,0110	10	72,82465	158,5000	93,18	285,45	
2013	171,2690	10	85,17048	179,4200	60,00	286,31	
2014	137,8320	10	88,97450	125,3200	27,30	310,50	
2015	99,6470	10	112,96366	66,8000	2,05	398,91	
Total	132,3968	50	90,64967	106,3100	2,05	298,91	

De las tablas 10 y 11 se puede obtener la misma información que las que contienen los valores de cuantificación por NanoDrop®: en el caso del tejido en fresco, la media va aumentando a excepción del año 2015; en el caso de tejido incluido en parafina, no se observan grandes diferencias en cuanto a los años se refiere.

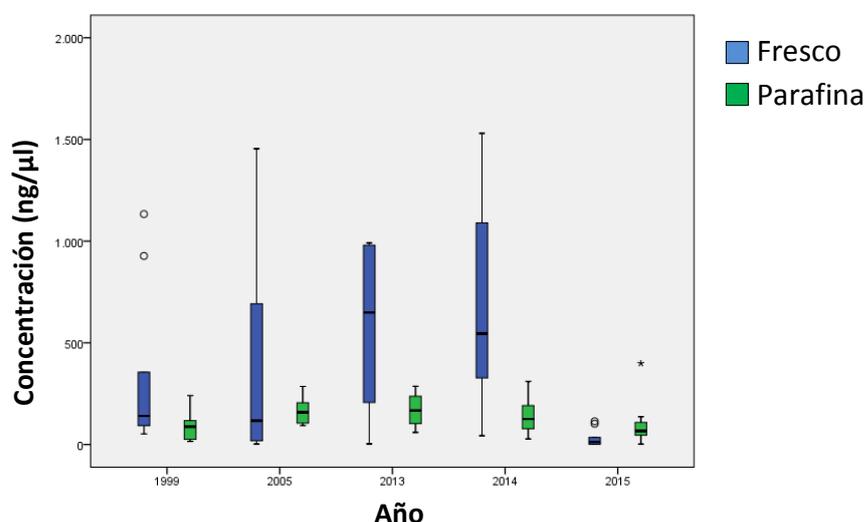


Figura 11. Representación de las diferentes concentraciones (medadas con Qubit®) de RNA que se consiguieron obtener tanto en tejido fresco congelado como en tejido incluido en parafina a lo largo de los diferentes años.

Como se puede observar en ambas figuras, se consiguió extraer mucha más cantidad de RNA a partir del tejido en fresco. En el caso del año 1999 y 2005, la cantidad es algo menor que en el resto de años; esto se puede deber al método de congelación empleado, ya que la muestra se introducía en el nitrógeno líquido, por lo que la bajada de temperatura era muy brusca, lo que se traduce en la presencia de cristales que dañan el tejido y más concretamente el material genético. Es por esta razón que la cantidad de RNA puede ser menor.

A partir de las muestras de los años 2013 y 2014, se consiguió extraer más cantidad de muestra, lo que se puede deber al cambio de método de congelación (ya que previamente al nitrógeno líquido se introducían en isopentano, lo que permitía un descenso de la temperatura más suave) o porque llevan mucho menos tiempo almacenadas.

El caso del año 2015 es un tanto particular, pues a partir de las muestras de tejido en fresco congelado almacenado en O.C.T.™ se consiguió muy poco RNA. El material inicial con el que se partió fueron 3 cortes de 10 μm, por lo que no se partía con la misma cantidad de material que el resto de años. Si se desea obtener más cantidad de RNA para posteriores estudios, se deben realizar más cortes en el microtomo.

La cantidad de RNA extraída a partir del tejido incluido en parafina es mucho menor que en el caso del tejido en fresco congelado: en este método de fijación se utilizan sustancias químicas que pueden dañar este material genético, y el proceso de extracción cuenta con más pasos (como la desparafinación), por ende, el material genético, ya de por sí degradado, tiene más posibilidades de perderse en el proceso. Además, la cantidad de material de partida era de 3 cortes de 10 μm, cantidad menor que en el caso del tejido en fresco, de donde se partía con varios trocitos más grandes.

Otra información obtenida a partir de los gráficos es la diferencia de concentraciones obtenida por método espectrofotométrico (NanoDrop®) o con método fluorométrico (Qubit®). Este último es altamente selectivo para el RNA (monocatenario), es decir, no reconoce el DNA de doble cadena, por lo que el resultado de la cuantificación es más preciso que la cuantificación por NanoDrop®. De este modo, las concentraciones medidas con Qubit® son menores, pues no tienen en cuenta moléculas de DNA o nucleótidos sueltos presentes en la muestra (en la cuantificación de algunas muestras, el valor obtenido con Qubit® es mayor; este hecho debe ser estudiado más en profundidad). En consecuencia, se debería emplear el método fluorométrico si se desea obtener una cuantificación precisa de RNA y no comprometer análisis posteriores.

4.1.2. Determinación de la calidad

Los parámetros estudiados para definir la calidad de una muestra fueron la pureza, obtenida a partir de los ratios de absorbancia, la integridad, definida por el valor RIS, y la funcionalidad, medida en base a los resultados de la RT-qPCR.

4.1.2.1. Pureza

Se obtuvieron los ratios de absorbancia A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} para determinar la presencia de contaminantes, y se recogieron en la tabla 12:

Tabla 12. Ratios de absorbancia del total de muestras a estudio.

CASOS	A_{260}/A_{280}		A_{260}/A_{230}		CASOS	A_{260}/A_{280}		A_{260}/A_{230}	
	FRESCO	PARAFINA	FRESCO	PARAFINA		FRESCO	PARAFINA	FRESCO	PARAFINA
1	2,07	0,76	2,16	0,35	26	2,02	1,99	1,82	0,43
2	2,03	1,2	2,18	0,94	27	2,01	2,02	1,67	1,86
3	2,08	1,87	2,31	1,53	28	1,94	1,98	0,65	0,58
4	2,07	1,9	2,3	1,71	29	2,16	1,98	1,42	1,13
5	2,03	1,8	1,15	1,37	30	2,16	2,02	1,41	1,6
6	2,01	1,91	0,86	1,45	31	2,08	2,04	2,19	1,32
7	1,99	1,74	1,2	0,67	32	2,11	2,02	2,29	1,12
8	1,78	1,88	0,21	0,61	33	2,22	1,99	2	1,61
9	2,02	1,24	1,67	0,83	34	2,15	1,75	1,91	1,06
10	1,67	2,03	0,24	2,01	35	2,2	2	2,18	1,83
11	2,06	1,92	1,94	1,39	36	2,12	1,97	2,23	1,53
12	2,11	1,93	2,22	1,62	37	2,02	1,89	1,67	1,35
13	2,04	1,98	1,60	1,78	38	1,6	1,87	0,66	0,5
14	2,06	1,94	2,17	1,42	39	1,93	1,64	1,01	0,61
15	2,07	1,86	2,27	1,37	40	2,11	1,88	1,96	1,46
16	1,49	1,9	0,65	1,5	41	1,83	1,33	0,60	0,3
17	1,73	1,99	0,70	1,56	42	1,93	1,97	1,57	0,58
18	1,81	2,02	0,87	1,98	43	1,85	1,78	1,06	0,15
19	2,11	2	1,86	1,05	44	1,26	1,97	0,54	0,12
20	1,54	1,89	0,15	0,8	45	1,96	2,03	1,32	1,83
21	2,09	1,95	2,13	1	46	1,42	1,04	0,67	0,11
22	2,08	1,97	2,32	1,27	47	1,78	1,97	1,08	0,33
23	2,07	2,03	2,28	1,13	48	1,35	1,84	0,66	1,02
24	2,27	2	0,86	0,79	49	1,76	1,95	0,22	1,22
25	2,06	2,02	2,28	1,6	50	1,50	1,96	0,56	1,14

Las tablas 13 y 14 recogen los valores estadísticos correspondientes al ratio A_{260}/A_{280} de ambos tipos de muestras:

Tabla 13. Valores del ratio A_{260}/A_{280} de muestras de tejido en fresco.

Año	Media	N	Desviación Estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>p-value</i>
1999	1,98	10	0,14	2,03	1,67	2,08	0,000
2005	1,90	10	0,24	2,05	1,49	2,11	
2013	2,09	10	0,09	2,08	1,94	2,27	
2014	2,05	10	0,18	2,11	1,60	2,22	
2015	1,66	10	0,26	1,77	1,26	1,96	
Total	1,94	50	0,24	2,03	1,26	2,27	

Tabla 14. Valores del ratio A_{260}/A_{280} de muestras de tejido fijado e incluido en parafina.

Año	Media	N	Desviación Estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>p-value</i>
1999	1,6330	10	0,41716	1,8350	0,76	2,03	0,015
2005	1,9430	10	0,05272	1,9350	1,86	2,02	
2013	1,9960	10	0,02633	11,9950	1,95	2,03	
2014	1,9050	10	0,12834	1,9300	1,64	2,04	
2015	1,7840	10	0,33093	1,9550	1,04	2,03	
Total	1,8522	50	0,27013	1,9500	0,76	2,04	

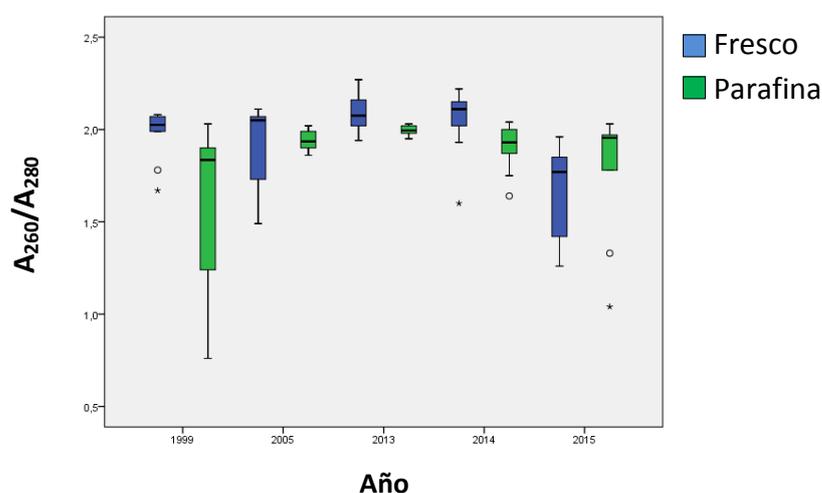


Figura 12. Representación de los ratios de pureza (A_{260}/A_{280}) de ambos tipos de tejido en los diferentes años.

Tanto en la figura 12 como en las tablas 13 y 14 se puede observar que el RNA obtenido a partir de tejido en fresco es mucho más puro, pues, a excepción del año 2005, la media se encuentra entre los valores 1,98 y 2,05, lo que se consideraría un RNA de alta calidad (el *p-value* es menor a 0,05: diferencia significativa). En el caso del año 2015, la pureza del material baja, ya que está incluido en el compuesto O.C.T.[™]: al obtenerse una menor concentración de RNA en el mismo volumen, cualquier componente del compuesto O.C.T.[™] arrastrado durante el proceso de extracción, aunque esté en muy baja concentración, hace que el ratio descienda de manera significativa. En general, la disminución de este ratio se corresponde con la presencia del fenol (que absorbe a 280 nm) presente en el reactivo Trizol empleado para la extracción en este tipo de tejido.

En cuanto al tejido en parafina, los ratios obtenidos son menores que en el caso del tejido en fresco, pues este tipo de tejido ha sufrido un procesamiento mucho más largo y con la utilización de más sustancias; de este modo, esto se traduce en una contaminación de la muestra con alcoholes empleados durante la fijación y la desparafinación, así como con

proteínas debido al entrecruzamiento que se produce entre estas y los ácidos nucleicos con el uso del formaldehído.

Por último, en ambos tipos de tejido se puede observar una tendencia a lo largo de los años a aumentar el ratio de pureza, señal de que muestras más recientes acumulan menos contaminación.

Para el ratio A_{260}/A_{230} también se calcularon los datos estadísticos y se representaron en un diagrama:

Tabla 15. Valores del ratio A_{260}/A_{230} de muestras de tejido en fresco.

Año	Media	N	Desviación Estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>p-value</i>
1999	1,4280	10	0,81955	1,4350	0,21	2,31	0,017
2005	1,4430	10	0,77766	1,7300	0,15	2,27	
2013	1,6840	10	0,59865	1,7450	0,65	2,32	
2014	1,8100	10	0,55164	1,9800	0,66	2,29	
2015	0,8280	10	0,41360	0,6650	0,22	1,57	
Total	1,4386	50	0,71003	1,5850	0,15	2,32	

Tabla 16. Valores del ratio A_{260}/A_{230} de muestras fijadas e incluidas en parafina.

Año	Media	N	Desviación Estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>p-value</i>
1999	1,1470	10	0,54205	1,1550	0,35	2,01	0,016
2005	1,4470	10	0,33774	1,4600	0,80	1,98	
2013	1,1390	10	0,46170	1,1300	0,43	1,86	
2014	1,2390	10	0,42522	1,3350	0,50	1,83	
2015	0,6800	10	0,59044	0,4550	0,11	1,83	
Total	1,1304	50	0,52502	1,1800	0,11	2,01	

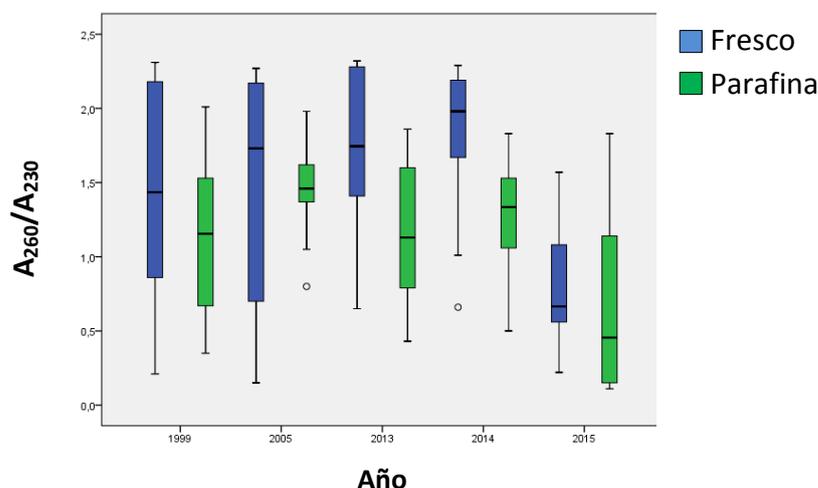


Figura 13. Representación de los ratios A_{260}/A_{230} de los dos tipos de muestra a lo largo de los años.

En el caso del ratio A_{260}/A_{230} , que hace referencia a la contaminación por sales caotrópicas y otros elementos, los resultados obtenidos también ponen de manifiesto que el tejido en fresco congelado es más puro (a excepción del año 2015 debido al uso del compuesto O.C.T™); sin embargo, este ratio no se considera relevante a la hora de estudiar la pureza de una muestra de RNA.

4.1.2.2. Integridad

La integridad de las muestras se ha estudiado obteniendo el RIS (*RNA Integrity Score*) a partir de la electroforesis capilar.

Tabla 17. Valores del RIS.

Casos	Tejido	Año	RIS	Casos	Tejido	Año	RIS
4	Parafina	1999	nd	26	Congelado	2013	4,7
4	Congelado	1999	3,9	29	Congelado	2013	5,6
11	Congelado	2005	3,6	30	Congelado	2013	5,2
12	Congelado	2005	3,7	31	Congelado	2014	3,1
14	Parafina	2005	nd	32	Congelado	2014	6,1
14	Congelado	2005	3,6	34	Congelado	2014	2,8
15	Congelado	2005	3	36	Congelado	2014	4,9
22	Congelado	2013	5,6	40	Congelado	2014	4,8

En la tabla 17 se muestran los valores RIS de algunos casos en concreto; con el resto de casos no fue posible estudiar la integridad, pues el RNA estaba muy poco concentrado y el programa del equipo QIAxcel® no posibilitaba trabajar con tan poca concentración. Una solución para tratar de concentrar el RNA consistiría en su precipitación con el uso de acetato sódico y etanol: en primer lugar se añade el acetato y el etanol al 100% de pureza; esta solución se incuba *overnight* a -20°C, y posteriormente se centrifuga, quedando un pellet en el fondo del tubo compuesto enteramente por el RNA. Tras esto, se procede a realizar lavados con etanol, y por último, se centrifuga, se elimina el etanol y se resuspende en el tampón deseado (Walker & Lorsch, 2013).

Como bien se puede observar, muestras más recientes cuentan con un RIS mayor, señal de que el RNA está más íntegro. En el caso del tejido incluido en parafina, se puede llegar a la conclusión de que el RNA sufre un grado mucho más alto de degradación que en el tejido en fresco, pues del mismo caso se ha conseguido obtener un valor de RIS para tejido congelado pero no para su correspondiente muestra en parafina.

Muestras con valores de RIS entre 7 y 10 se considerarían íntegras, mientras que valores por debajo del 3 reflejan un RNA muy degradado.

En el caso del ratio ribosomal 28S:18S, el programa también da la posibilidad de calcular este ratio. El valor ideal de este es 2, pero es muy difícil de obtener en muestras clínicas, y además, por estudios realizados recientemente, parece no estar totalmente relacionado con la integridad del RNA total, ya que se puede contar con un ratio bajo pero obtener un buen resultado de la qPCR. De hecho, no fue posible obtener ningún ratio 28S:18S en el total de casos a estudio.

Los electroferogramas generados con este tipo de electroforesis reflejan el grado de degradación de la muestra.

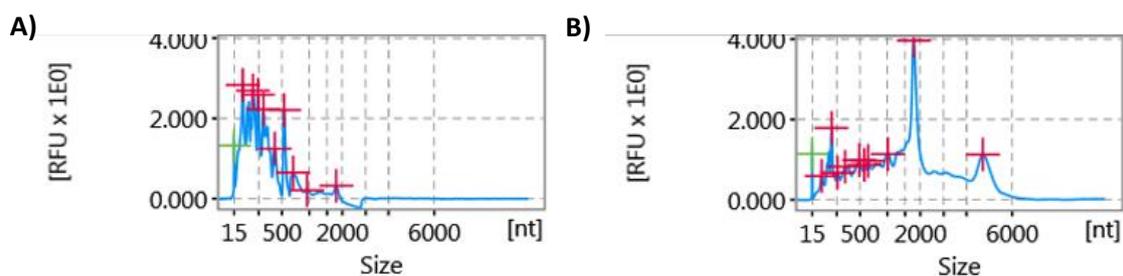


Figura 14. Electroferogramas donde se representa el tamaño de molécula frente a la intensidad de fluorescencia. A) Electroferograma del caso 14 (año 2005). B) Electroferograma del caso 32 (año 2014).

En la figura 14 se puede observar el grado de degradación del RNA en base a los picos del electroferograma. En el caso del año 2005, la presencia de muchos fragmentos pequeños de RNA informa sobre el estado de degradación del mismo; en el caso del año 2014, la integridad mejora, pues aparecen los dos picos correspondientes al 28S y al 18S, y la cantidad de fragmentos pequeños disminuye.

En conclusión, una muestra reciente cuenta con un material genético menos degradado, y éste es mejor si proviene de tejido en fresco.

4.1.2.3. Funcionalidad

La funcionalidad del RNA extraído se estudió valorando el Ct de la PCR cuantitativa a tiempo real de los dos genes *assay*, obteniendo los siguientes valores:

Tabla 18. Valores del *Cycle Treshold* de las reacciones en cadena de la polimerasa.

CASOS	Ct (microglobulina)		Ct (GAPDH)		CASOS	Ct (microglobulina)		Ct (GAPDH)	
	FRESCO	PARAFINA	FRESCO	PARAFINA		FRESCO	PARAFINA	FRESCO	PARAFINA
1	19,51	27,05	19,55	26,06	26	18,33	22,29	20,67	25,94
2	23,27	27,12	22,69	27,57	27	19,57	23,12	20,68	24,92
3	17,82	27,07	19,33	28,63	28	19,07	22,42	20,33	24,55
4	22,08	26,81	22,17	28,89	29	20,54	20,66	22,49	24,6
5	24,73	28,86	24,43	30,59	30	23,53	23,37	23,59	25,74
6	24,59	27,55	25,04	28,09	31	24,26	20,95	24,93	23,4
7	26,65	27,9	25,35	28,75	32	21,51	20,91	21,22	22,58
8	23,54	27,5	23,82	27,7	33	16,66	20,36	19,09	23,51
9	27,73	25,23	26,83	27,68	34	22,07	25,37	22,3	27,38
10	20,69	26,51	20,67	26,68	35	19,66	21,05	22,6	23,77
11	23,09	24,94	23,49	27,16	36	19,17	23,26	20,34	23,63
12	24,90	28,37	22,76	27,33	37	26,48	21,87	27,18	22,33
13	19,35	24,37	20,88	26,34	38	21,66	22,89	22,05	23,11
14	22,93	26,88	22,03	30,14	39	21,95	25,31	22,86	26,16
15	20,87	28,19	20,6	28,23	40	24,29	22,71	22,42	25,29
16	22,44	25,64	22,92	26,91	41	19,56	26,72	21,45	29,03
17	19,83	22,98	21,62	24,63	42	20,44	22,72	19,44	23,75
18	19,62	24,44	19,19	25,17	43	20,02	22,44	21,66	24,98
19	16,79	22,84	19,86	26,12	44	21,12	21,35	22,71	23,79
20	29,81	25,07	27,12	26,94	45	20,67	23,82	20,26	23,91
21	18,74	23,27	19,23	26,3	46	23,22	36,76	23,77	38,66
22	18,81	24,09	17,87	24,53	47	21,41	22,78	21,46	23,88
23	29,59	23,4	25,53	23,75	48	23,85	20,73	26,16	23,84
24	26,08	22,53	27,02	25,13	49	25,05	18,62	26,76	20,98
25	26,37	20,52	25,56	23,56	50	23,75	20,47	23,87	22,03

Tabla 19. Valores del Ct (gen *assay*: microglobulina) de muestras de tejido en fresco.

Año	Media	N	Desviación Estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>p-value</i>
1999	23,0610	10	3,10445	23,4050	17,82	27,73	0,850
2005	21,9630	10	3,61257	21,6550	16,79	29,81	
2013	22,3410	10	3,53635	22,3550	18,33	29,59	
2014	22,4680	10	1,79215	22,2900	20,36	25,37	
2015	23,6410	10	5,09510	22,5800	18,62	36,76	
Total	22,6948	50	3,48966	22,4400	16,79	36,76	

Tabla 20. Valores del Ct de microglobulina de muestras fijadas e incluidas en parafina.

Año	Media	N	Desviación Estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>p-value</i>
1999	27,1600	10	0,94263	27,0950	25,23	28,86	0,001
2005	25,3720	10	1,93098	25,0050	22,84	28,37	
2013	22,5670	10	1,17307	22,8250	20,52	24,09	
2014	22,4680	10	1,79215	22,2900	20,36	25,37	
2015	23,6410	10	5,09510	22,5800	18,62	36,76	
Total	24,2416	50	3,12182	23,3850	18,62	36,76	

Con los valores de las tablas 19 y 20 se puede concluir que las diferencias de Ct a lo largo de los años en tejido en fresco no son significativas; en cambio, las muestras fijadas e incluidas en parafina sí que muestran una tendencia a disminuir el valor del Ct, considerándose este hecho estadísticamente significativo. Se puede observar mejor con el diagrama *box-and-whisker*:

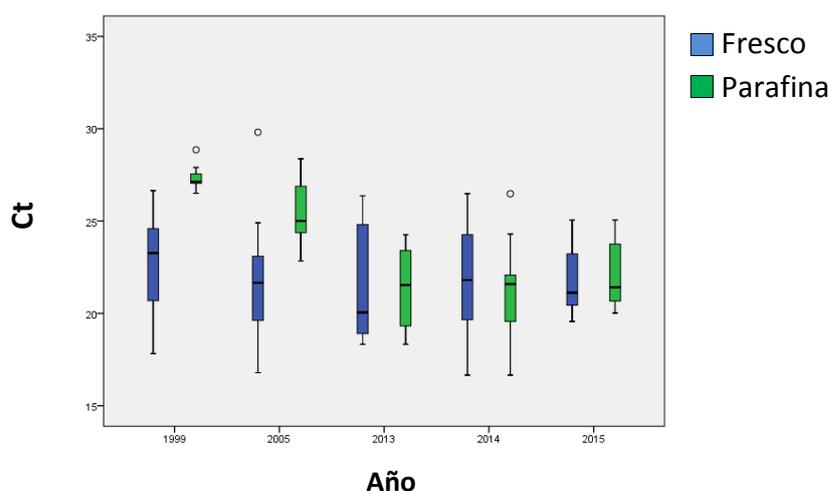


Figura 15. Representación del Ct (microglobulina) de las muestras de los diferentes años.

Como se puede observar en la figura 15, el Ct de amplificación de tejido en fresco es mucho menor que el de parafina. Un Ct menor implica una mayor funcionalidad, pues se alcanza antes el umbral de fluorescencia establecido, lo que se traduce en una mayor rapidez de reacción. La polimerasa, por ende, está trabajando mejor sobre ese material.

Con el paso de los años existe una tendencia en ambos tipos de tejidos a reducir el Ct, por lo que el paso de los años influye en la funcionalidad de los genes a estudio.

Lo mismo ocurre si se estudian los parámetros obtenidos a partir de la qPCR del gen GAPDH:

Tabla 21. Valores del Ct (gen assay: GAPDH) de muestras de tejido en fresco.

Año	Media	N	Desviación Estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	p-value
1999	22,9880	10	2,55287	23,2550	19,33	26,83	0,928
2005	22,0470	10	2,25270	21,8250	19,19	27,12	
2013	22,2970	10	3,04140	21,5850	17,87	27,02	
2014	22,4990	10	2,26392	22,3600	19,09	27,18	
2015	22,7540	10	2,39682	22,1850	19,44	26,76	
Total	22,5170	50	2,43647	22,3600	17,87	27,18	

Tabla 22. Valores del Ct del gen GAPDH de muestras fijadas e incluidas en parafina.

Año	Media	N	Desviación Estándar	Mediana	Mínimo	Máximo	p-value
1999	28,0640	10	1,26095	27,8950	26,06	30,59	0,010
2005	26,8970	10	1,54878	26,9250	24,63	30,14	
2013	24,9020	10	0,89864	24,7600	23,56	26,30	
2014	24,1160	10	1,63323	23,5700	22,33	27,38	
2015	25,4850	10	5,08025	23,8600	20,98	38,66	
Total	25,8928	50	2,85618	25,5150	20,98	38,66	

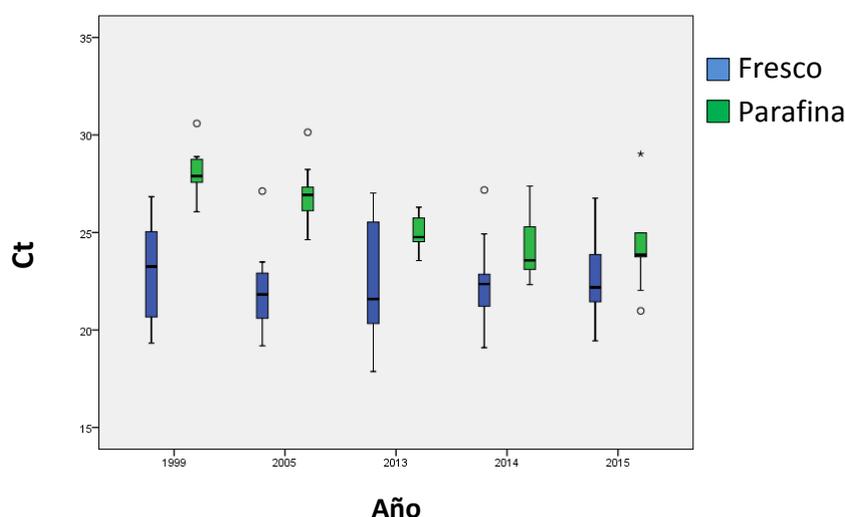


Figura 16. Representación del Ct (GAPDH) de las muestras de los diferentes años.

En la figura 16 queda demostrada la tendencia de las muestras fijadas e incluidas en parafina a disminuir el Ct en función de su antigüedad, señal de que el tiempo de almacenamiento de este tipo de muestras influye notablemente en la funcionalidad de los ácidos nucleicos. Los mejores resultados se consiguen de nuevo con el tejido en fresco congelado, demostrando la teoría de que éste es un mejor método de conservación; en este tipo de muestras, el paso de los años no es estadísticamente significativo, pues el tejido almacenado de tal forma conserva bien su calidad con el tiempo, pero en el caso del tejido fijado e incluido en parafina, el *p-value* obtenido es de 0,010, por lo que el tiempo en este tipo de muestras sí que influye, de modo que muestras almacenadas más recientemente cuentan con una mejor calidad del material genético.

De cada reacción de PCR se obtuvo, además del Ct, el gráfico de amplificación donde quedan representados los ciclos frente a la fluorescencia emitida por las sondas *TaqMan*[®] (Figura 17). Esta fluorescencia va aumentando conforme aumenta el producto de amplificación, pues se

van creando más hebras de DNA que sirven como molde para la hibridación de la sonda. El *threshold* o umbral de fluorescencia se estableció en 0,2.

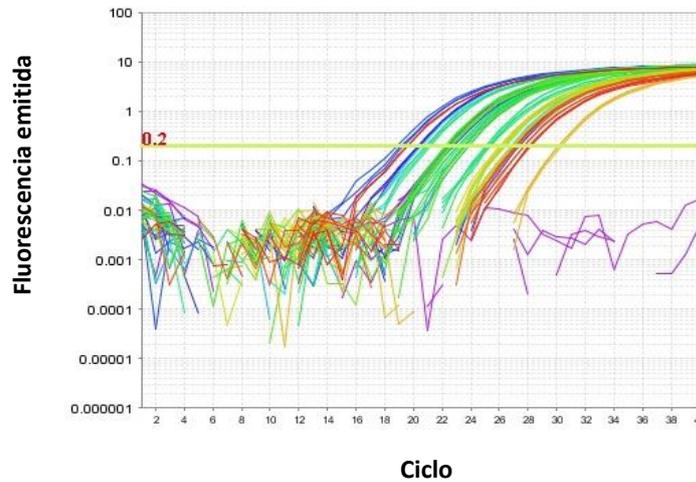


Figura 17. Ejemplo de *Amplification Plot*. Ciclos de amplificación frente a fluorescencia emitida de un conjunto de muestras.

4.2. Discusión

La medicina translacional y personalizada se está abriendo camino en el ámbito de la investigación biomédica. Esta disciplina se basa en el estudio de las bases moleculares patológicas del cáncer, y aplica este conocimiento con el fin de investigar y descubrir nuevos *targets* terapéuticos y biomarcadores que permitan un mejor abordaje tanto del diagnóstico como del pronóstico.

Para el desarrollo óptimo de este nuevo enfoque molecular se debe partir de un material de gran calidad, apto para poder realizar los análisis necesarios y obtener de este modo conclusiones que se correspondan con el estado real del tejido. En diversos estudios se ha comprobado la importancia de un buen almacenamiento y posterior procesamiento de las muestras a analizar, pues existen diversos factores que, si no se tienen en cuenta, pueden modificar la estructura tisular y más concretamente el material genético; esto se considera esencial en los proyectos de investigación, pues se trata de un proceso que abarca varios años y, por ende, las muestras deben ser almacenadas y procesadas de tal forma que se obtenga material de calidad sobre el cual trabajar.

En estos estudios se demostró que la degradación de los ácidos nucleicos y por tanto la disminución de su calidad comienza desde la manipulación quirúrgica (cuando se le extirpa el tejido al paciente), así como en el lento procesamiento de la muestra hasta que es almacenada, las condiciones no óptimas de este almacenamiento, y la duración y la temperatura del mismo (Zhou *et al.*, 2015).

Para estudiar la calidad de las muestras del Biobanco, se extrajo y se determinó la calidad del RNA de 100 muestras en total, 50 de tejido en fresco congelado y 50 de tejido incluido en parafina, desde una antigüedad de 17 años hasta la actualidad.

Los diferentes parámetros analizados fueron la pureza, la integridad y la funcionalidad. A partir de su estudio, se pudo observar que el RNA de tejido en fresco congelado conserva mucho mejor el material genético, pues cuenta con menos contaminantes y menor grado de degradación. El proceso de congelación ha ido mejorando con el tiempo en paralelo a la calidad obtenida, pero con el actual método de conservación en O.C.T.[™] no se obtuvieron los resultados esperados, señal de que se debe investigar en más profundidad el modo de acción de este compuesto e intentar eliminarlo previamente a la realización de estudios.

En cuanto al material incluido en parafina, se demostró científicamente que este método de almacenamiento degrada mucho más el material genético, por lo que, aunque sea el material más usado actualmente, aún queda recorrido en cuanto a la mejora de las condiciones de fijación y los medios fijativos utilizados.

El último parámetro analizado, la integridad, se determinó mediante electroforesis capilar. Los resultados obtenidos no fueron los esperados, pues en el caso de muchas muestras no se pudo determinar el RIS (*RNA Integrity Score*), y sin embargo, estas mismas contaban con una buena funcionalidad, por lo que el RNA no debería estar tan fragmentado como para que ni siquiera lo detectara el equipo QIAxcel. Esto se puede deber a que, antes de estudiar este parámetro, el RNA sufrió varios ciclos de congelación y descongelación, por lo que sería ideal, antes de comenzar con el proceso de determinación de la calidad, establecer varias alícuotas para cada uno de los parámetros. De este modo, el material de partida sufrirá menos y no llegará degradado al final del proceso.

Tras la determinación de la calidad de las muestras, hay que tener en cuenta para qué va a ser destinada cada una de ellas, es decir, en qué tipo de estudio va a ser empleada. Si el RNA de una muestra en concreto va a ser empleado para realizar una RT-qPCR, se deberá estudiar la posibilidad o no de realizar ese estudio según el Ct que haya obtenido; no obstante, se puede dar que esa muestra no tenga una pureza óptima, pero si es funcional, el estudio podrá ser llevado a cabo. Es por ello que se deben analizar todas las variables implicadas en la calidad, pero, tras ello, es posible que sólo se necesite tener en cuenta un solo parámetro en función de lo que trate la investigación a realizar.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha estudiado la calidad del RNA procedente de las muestras del Biobanco del IVO, obteniéndose las siguientes conclusiones:

- El método de almacenamiento influye en la calidad de las muestras, siendo de mayor calidad el RNA obtenido a partir de tejido en fresco congelado.
- El tiempo de almacenamiento de la muestra es también un factor influyente, puesto que a mayor tiempo de almacenaje, mayor degradación.
- Es esencial la determinación de la calidad del RNA previamente a la realización de estudios.
- Es necesario estandarizar los procedimientos de trabajo en lo que a almacenamiento y procesamiento de la muestra se refiere, para así conseguir una reproducibilidad de los resultados.

6. BIBLIOGRAFÍA

- BONIN, S.; HLUBEK, F.; BENHATTAR, J.; DENKERT, C.; DIETEL, M.; FERNANDEZ, P.L.; HÖFLER, G.; KOTHMAIER, H.; KRUSLIN, B.; MAZZANTI, C.M.; PERREN, A.; POPPER, H.; SCARPA, A.; SOARES, P.; STANTA, G. & GROENEN, P. (2010). Multicentre validation study of nucleic acids extraction from FFPE tissues. *Virchows Archiv*, 457(3), 309–317.
- BOTTI, G.; FRANCO, R.; CANTILE, M.; CILIBERTO, G. & ASCIERTO, P.A. (2012). Tumor biobanks in translational medicine. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 1.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction, 159, 156-169.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate – phenol – chloroform extraction : twenty-something years on, 1(2), 581–585.
- COPOIS, V.; BIBEAU, F., BASCOUL-MOLLEVI, C.; SALVETAT, N., CHALBOS, P.; BAREIL, C.; CANDEIL, L.; FRASLON, C.; CONSEILLER, E.; GRANCI, V.; MAZIÈRE, P.; KRAMAR, A.; YCHOU, M.; PAU, B.; MARTINEAU, P.; MOLINA, F. & DEL RIO, M. (2007). Impact of RNA degradation on gene expression profiles: Assessment of different methods to reliably determine RNA quality. *Journal of Biotechnology*, 127(4), 549-559.
- DE CREMOUX, P.; BIECHE, I.; TRAN-PERENNOU, C.; VIGNAUD, S. & BOUDOU, E. (2004). Inter-laboratory quality control for hormone-dependent gene expression in human breast tumors using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Endocrine Related Cancer*, 11(3), 489-495.
- DOM, N. & PURRI, N.C. (2016). Biobancos y su importancia en el ámbito clínico y científico, 10(5), 304-308.
- FLEIGE, S. & PFAFFL, M.W. (2006). RNA Integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 126-139.
- GALLUP, J.M.; SOW, F.B.; VAN GEELLEN, A. & ACKERMANN, M.R. SPUD qPCR Assay Confirms PREXCEL-Q Software’s Ability to Avoid qPCR Inhibition. (2012). *NIH Public Acces*, 12(3), 129-134.
- GENE-QUANTIFICATION.DE (2016). *Gene-Quantification.info – The reference in qPCR – Academic & Industrial Information Platform*. Accessed 1 Apr. 2016. <http://www.gene-quantification.de/>
- GROELZ, D.; SOBIN, L.; BRANTON, P.; COMPTON, C.; WYRICH, R. & RAINEN, L. (2013). Non-formalin fixative versus formalin-fixed tissue: A comparison of histology and RNA quality. *Experimental and Molecular Pathology*, 94(1), 188-194.
- IMBEAUD, S.; GRAUDENS, E.; BOULANGER, V.; BARLET, X.; ZABORSKI, P.; EVENO, E.; MUELLER, O.; SCHROEDER, A. & AUFRAY, C. (2005). Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Research*, 33(6), 1-12.

- INSTITUTO VALENCIANO DE ONCOLOGIA (IVO), 2016. *Biobanco*. Accessed 1 Apr. 2016. <http://www.ivo.es/investigacion/biobanco/>
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), 2016. *Globocan 2012*. Accessed 1 Apr. 2016. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
- JOHNSON, M.; BRZOSKA, P.; PETRAUSKENE, O. & MELANCON, C. (2005). Using Real –Time PCR for Pathogen Detection. Volume 25, Number 14.
- LAN, C.C.; TANG, R.; LEONG, I.U.S. & LOVE, D.R. (2009). Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) of Zebrafish transcripts: Optimization of RNA extraction, quality control considerations and data analysis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(10), 1-13.
- MASUDA, N.; OHNISHI, T.; KAWAMOTO, S.; MONDEN, M. & OKUBO, K. (1999). Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples, 27(22), 4436-4443.
- MORENTE, M.M.; MAGER, R.; ALONSO, S.; PEZZELLA, F.; SPATZ, A. & KNOX, K. (2006). TuBaFrost 2: Standardising tissue collection and quality control procedures for a European virtual frozen tissue bank network, 2, 2-9.
- MUELLER, O. & SCHROEDER, A. (2004). RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control Application. *Nano*, 1-8.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI), 2016. *Cancer Statistics*. Accessed 1 Apr. 2016. <http://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics>
- NOLAN, T. & BUSTIN, S. (2008). Procedures for quality control of RNA samples for use in quantitative reverse transcription PCR. *Essentials of Nucleic Acid Analysis*, 189-207.
- NOLAN, T.; HANDS, R.E.; OGUNKOLADE, W. & BUSTIN, S. (2006). SPUD: A quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. *Analytical Biochemistry*, 351(2), 308-310.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD), 2016. *Biological Resource Centres*. Accessed 1 Apr. 2016. <http://www.oecd.org/sti/biotech/biologicalresourcecentres.htm>
- SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOCKER, S.; SALOWSKY, R.; LEIBER, M.; GASSMANN, M.; LIGHTFOOT, S.; MENZEL, W.; GRANZOW, M. & RAGG, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7(1), 3.
- VERMEULEN, J.; DE PRETER, K.; LEFEVER, S.; NUYTENS, J.; DE VLOED, F.; DERVEAUX, S.; HELLEMANS, J.; SPELEMAN, F. & VANDESOMPELE, J. (2011). Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. *Nucleic Acids Research*, 39(9).
- WALKER, S.E. & LORSCH, J. (2013). RNA Purification – Precipitation Methods. *Methods in Enzymology*, Volume 350, 337-343.

ZHOU, J.; SAHIN, A.A. & MYERS, J.N. (2015). . Biobanking in Genomic Medicine. *HHS Public Access*, 139(6), 812-818.

Bibliografia complementaria:

BRIMO, F.; APRIKION, A.; LATOUR, M.; TÊTU, B.; DOUEIK, A.; SCARLATA, E.; HAMEL, L.; MCKERCHER, G.; SAAD, F.; LACOMBE, L.; CAMEL, M. & CHEVALIER, S. (2013). Strategies for biochemical and pathologic quality assurance in a large multi-institutional biorepository; The experience of the PROCURE Quebec Prostate Cancer Biobank. *Biopreservation and Biobanking*, 11(5), 285-90.

CARROL, E.D.; SALWAY, F.; PEPPER, S.D.; SAUNDERS, E.; MANKHAMNO, L.A.; OLLIER, W.E.; HART, C.A. & DAY, P. (2007). Successful downstream application of the Paxgene Blood RNA system from small blood samples in paediatric patients for quantitative PCR analysis. *BMC Immunology*, 8, 20.

CHENG, L.; DAVISON, D.D.; ADAMS, J.; LOPEZ-BELTRAN, A.; WANG, L.; MONTIRONI, R. & ZHANG, S. (2014). Biomarkers in bladder cancer: Translational and clinical implications. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 89(1), 73-111.

DIE, J.V.; OBRERO, A.; GONZALEZ-VERDEJO, C.I. & ROMAN, B. (2011). Characterization of the 3':5' ratio for reliable determination of RNA quality. *Analytical Biochemistry*, 419(2), 336-338.

GABERT, J.; BEILLARD, E.; VAN DER VELDEN, V.H.J.; BI, W.; GRIMWADE, D.; PALLISGAARD, N.; BARBANY, G.; CAZZANIGA, G.; CAYUELA, J.M.; CAVE, H.; PANE, F.; AERTS, J.L.E.; DE MICHELI, D.; THIRION, X.; PRADEL, V.; GONZALEZ, M.; VIEHMANN, S.; MALEC, M.; SAGLIO, G. & VAN DONGEN, J.J.M. (2003). Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer Program. *Leukemia*, 17(12), 2318-57.

GRANATO, A.; GIANTIN, M.; ARIANI, P.; CARMINATO, A.; BARATTO, C.; ZORZAN, E.; VASCELLARI, M.; BOZZATO, E.; DACASTO, M. & MUTINELLI, F. (2014). DNA and RNA isolations from canine oncologic formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for downstream '-omic' analyses: possible or not? *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnostics, Inc*, 26(1), 117-24.

LEHMANN, U. & KREIPE, H. (2001). Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods*, 25(4), 409-18.

MALENTACCHI, F.; PAZZAGLI, M.; SIMI, L.; ORLANDO, C.; WYRICH, R.; GÜNTHER, K.; VERDERIO, P.; PIZZAMIGLIO, S.; CINISELLI, C.M.; ZHANG, H.; KORENKOVA, V.; RAINEN, L.; BAR, T.; KUBISTA, M. & GELMINI, S. (2014). SPIDIA-RNA: Second External Quality Assessment for the Pre-Analytical Phase of Blood Samples Used for RNA Based Analyses. *PLOS ONE*, 9(11).

MATHIESON, W. & THOMAS, G.A. (2013). Simultaneously extracting DNA, RNA, and protein using kits: Is sample quantity or quality prejudiced? *Analytical Biochemistry*, 433(1), 10-18.

MICKE, P.; OSHIMA, M.; TAHMASEBPOOR, S.; REN, Z.P.; ÖSTMAN, A.; PONTEN, F. & BOTLING, J. (2006). Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens. *Laboratory Investigation*, 86(2), 202-211.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI), 2016. *What is cancer?* Accessed 1 Apr. 2016. <http://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>

NOLAN, T.; HANDS, R.E. & BUSTIN, S. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3), 1559-82.

NORHAZLIN, J.; NOR-ASHIKIN, M.N.K.; HOH, B.P.; SHEIKH ABDUL KADIR, S.H.; NORITA, S.; MOHD-FAZIRUL, M.; WAN-HAFIZAH, W.J.; RAZIF, D.; RAJIKIN, M.H. & ABDULLAH, B. (2015). Effect of DNase treatment on RNA extraction from preimplantation murine embryos. *Genetics and Molecular Research*, 14(3), 10172-10184.

OOSTERHUIS, J.W.; COEBERGH, J.W. & VEEN, E.V. (2003). Tumour banks: well-guarded treasures in the interest of patients, 3(January), 2468-2473.

PALMA, S.; ZWENGER, A.O.; CROCE, M.V.; ABBA, M.C. & LACUNZA, E. (2015). From Molecular Biology to Clinical Trials: Toward Personalized Colorectal Cancer Therapy. *Clinical Colorectal Cancer*, 1-12.

RUETTGER, A.; NEUMANN, S.; WIEDERANDERS, B. & HUBER, R. (2010). Comparison of different methods for preparation and characterization of total RNA from cartilage samples to uncover osteoarthritis in vivo. *BMC Research Notes*, 3, 7.

SIDOVA, M.; TOMANKOVA, S.; ABAFFY, P.; KUBISTA, M. & SINDELKA, R. (2015). Effects of post-mortem and physical degradation on RNA integrity and quality. *Biomolecular Detection and Quantification*, 5, 3-9.

SKRYPINA, N.A.; TIMOFEEVA, A.V.; KHASPEKOV, G.L.; SAVOCHKINA, L.P. & BEABEALASHVILLI, R.S. (2003). Total RNA suitable for molecular biology analysis. *Journal of Biotechnology*, 105(1-2), 1-9.

SMOLINSKI, D.V. & LEVERKOEHNE, I. (2005). Impact of formalin-fixation and paraffin-embedding on the ratio between mRNA copy numbers of differently expressed genes, 177-188.

SRINIVASAN, M.; SEDMAK, D. & JEWELL, S. (2002). Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am.J.Pathol.*, 161, 1961-1971.

TALLEY, C.R. (1996). Lessons from the other literature. *American Journal of Health-System Pharmacy: AJHP: Official Journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 53(5), 517.

TRABZUNI, D.; RYTEN, M.; WALKER, R.; SMITH, C.; IMRAN, S.; RAMASAMY, A.; WEALE, M.E. & HARDY, J. (2011). Quality control parameters on a large dataset of regionally dissected human control brains for whole genome expression studies. *Journal of Neurochemistry*, 119(2), 275-282.

7. ANEXO

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO (PNT) DEL IVO

Para elaborar un Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT), que tiene como objetivo evaluar la calidad del RNA de las muestras almacenadas en el BioFIVO, e implementarlo posteriormente en el Sistema de Gestión de Calidad del Biobanco, se procedió a establecer una escala de valores teniendo en cuenta los diferentes parámetros estudiados: *pureza, cuantificación, integridad y funcionalidad*.

El RNA de las muestras se dividió en dos grupos: de alto rendimiento, que se corresponde con el extraído de muestras en fresco congeladas, y de bajo rendimiento, perteneciente al tejido fijado e incluido en parafina. A partir del gran número de casos estudiados, se ha podido determinar un método mediante el cual otorgar al RNA un valor en función de los resultados obtenidos en el estudio de su calidad. Se elaboró de este modo una tabla con las puntuaciones a otorgar según unos valores de referencia establecidos.

Tabla 23. Valores de puntuación para el RNA de alto rendimiento.

CARACTERÍSTICA	ENSAYO	VALORES DE REFERENCIA	PUNTUACIÓN
Pureza	NanoDrop® 1000: Ratio A_{260}/A_{280}	2 - 2,2	2
		1,8 - 2	1
		< 1,8	0
Cuantificación	NanoDrop® y Qubit®	Qubit® ≥ 60% NanoDrop®	1
		Qubit® < 60% Nanodrop®	0
Integridad	Microelectroforesis capilar (RIS)	7-10	2
		3-10	1
		1-3	0
Funcionalidad	RT-qPCR (Ct)	<25	1
		>25	0

Tabla 2. Valores de puntuación para el RNA de bajo rendimiento.

CARACTERÍSTICA	ENSAYO	VALORES DE REFERENCIA	PUNTUACIÓN
Pureza	NanoDrop® 1000: Ratio A_{260}/A_{280}	2 - 2,2	2
		1,8 - 2	1
		< 1,8	0
Cuantificación	NanoDrop® y Qubit®	Qubit® ≥ 60% NanoDrop®	1
		Qubit® < 60% Nanodrop®	0
Integridad	Microelectroforesis capilar (RIS)	7-10	2
		3-10	1
		1-3	0
Funcionalidad	RT-qPCR (Ct)	<30	1
		>30	0

A partir de los valores de referencia establecidos, se procede a puntuar la muestra de RNA para cada parámetro estudiado en función de los resultados que se han obtenido.

Tabla 3. Puntuaciones obtenidas del RNA de alto rendimiento de los casos a estudio.

CASOS	PUREZA	CUANTIFICACIÓN	INTEGRIDAD	FUNCIONALIDAD	PUNTUACIÓN OBTENIDA
1	2	1	0	1	4
2	2	-	0	1	3
3	2	-	0	1	3
4	2	-	1	1	4
5	2	1	0	1	4
6	2	0	0	1	3
7	1	1	0	0	2
8	0	-	0	1	1
9	2	0	0	0	2
10	0	1	0	1	2
11	2	-	1	1	4
12	2	-	1	1	4
13	2	1	0	1	4
14	2	-	1	1	4
15	2	-	1	1	4
16	0	0	0	1	1
17	0	1	0	1	2
18	1	-	0	1	2
19	2	1	0	1	2
20	0	0	0	0	0
21	2	-	0	1	3
22	2	1	1	1	5
23	2	-	0	0	2
24	2	0	0	0	2
25	2	-	0	0	2
26	2	0	1	1	4
27	2	1	0	1	4
28	2	0	0	1	3
29	2	1	1	1	5
30	2	0	1	1	4
31	2	-	1	1	4
32	2	-	1	1	4
33	2	1	0	1	4
34	2	1	1	1	5
35	2	1	0	1	4
36	2	-	1	1	4
37	2	1	0	0	3
38	0	-	0	1	1
39	1	-	0	1	2
40	2	1	1	1	5
41	1	1	0	1	3
42	1	-	0	1	2
43	1	-	0	1	2
44	0	0	0	1	1
45	1	-	0	1	2
46	0	0	0	1	1
47	0	1	0	1	2
48	0	0	0	1	1
49	0	0	0	0	0
50	0	0	0	1	1

Tabla 4. Puntuaciones obtenidas del RNA de bajo rendimiento de los casos a estudio.

CASOS	PUREZA	CUANTIFICACIÓN	INTEGRIDAD	FUNCIONALIDAD	PUNTUACIÓN OBTENIDA
1	0	-	0	1	1
2	0	1	0	1	2
3	1	0	0	1	2
4	1	0	0	1	2
5	1	1	0	1	3
6	1	1	0	1	3
7	0	1	0	1	2
8	1	1	0	1	3
9	0	1	0	1	2
10	2	1	0	1	4
11	1	1	0	1	3
12	1	1	0	1	3
13	1	1	0	1	3
14	1	1	0	1	3
15	1	1	0	1	3
16	1	1	0	1	3
17	1	1	0	1	3
18	2	1	0	1	4
19	2	1	0	1	4
20	1	1	0	1	3
21	1	1	0	1	3
22	1	1	0	1	3
23	2	1	0	1	4
24	2	-	0	1	3
25	2	1	0	1	4
26	1	-	0	1	2
27	2	1	0	1	4
28	1	1	0	1	3
29	1	1	0	1	3
30	2	1	0	1	4
31	2	-	0	1	3
32	2	1	0	1	4
33	1	1	0	1	3
34	0	1	0	1	2
35	2	1	0	1	4
36	1	1	0	1	3
37	1	1	0	1	3
38	1	-	0	1	2
39	0	-	0	1	1
40	1	1	0	1	3
41	0	-	0	1	1
42	1	1	0	1	3
43	0	-	0	1	1
44	1	-	0	1	2
45	2	1	0	1	4
46	0	0	0	0	0
47	1	-	0	1	2
48	1	1	0	1	3
49	1	1	0	1	3
50	1	1	0	1	3

El rango de puntuación de calidad que puede adquirir una muestra oscila entre 0 (puntuación mínima en todos los parámetros estudiados) y 6 (puntuación máxima en todos ellos). Un valor de 6 implica que en todas las características estudiadas se ha obtenido la máxima puntuación posible, por lo que se tratará de un RNA de excelente calidad. La asignación de la calidad en función del valor obtenido se recoge en la tabla 4:

Tabla 4. Calidad del RNA en función de la puntuación obtenida.

Puntuación	Calidad
0-2	Mala
2-4	Buena
4-6	Excelente

Tabla 5. Nº de muestras según la puntuación final de calidad obtenida.

Calidad	Nº de muestras	
	RNA de alto rendimiento	RNA de bajo rendimiento
0	2	1
1	7	4
2	14	10
3	7	25
4	16	10
5	4	0
6	0	0

A continuación, se realiza un diagrama para comparar la calidad tanto del RNA de alto rendimiento como el de bajo rendimiento:

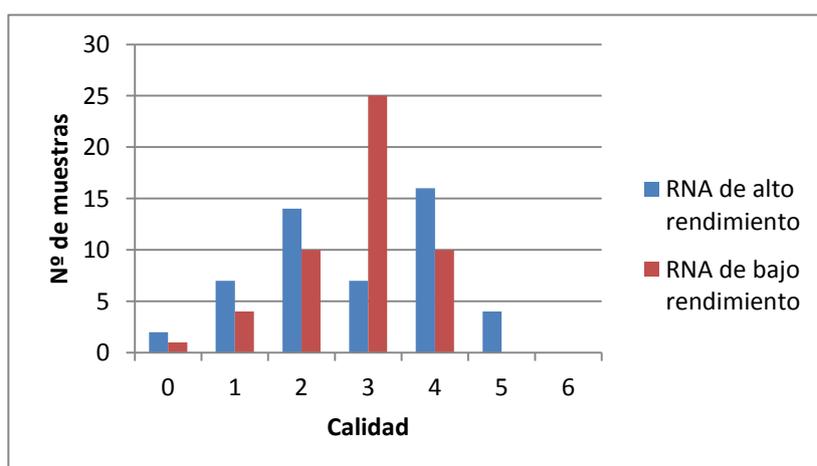


Figura 1. Nº de muestras distribuidas en función del valor de calidad obtenido.