



REVISIÓN

Biobancos, laboratorios clínicos e investigación biomédica

Juan M. Sánchez-Romero^a y José M. González-Buitrago^{b,c,d,*}

^aBanco Nacional de ADN, Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca, España

^bDirector del Biobanco, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España

^cUnidad de Investigación, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, España

^dDepartamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

Recibido el 7 de julio de 2010; aceptado el 1 de septiembre de 2010

Disponible en Internet el 28 de octubre de 2010

PALABRAS CLAVE

Biobanco;
Muestras;
Tejidos;
Plasma;
Líquidos biológicos;
ADN;
ARN

Resumen

Los biobancos son instituciones públicas o privadas sin ánimo de lucro dedicadas a la recogida, el procesamiento, el almacenamiento y la distribución de especímenes biológicos humanos, junto a los datos asociados con esas muestras. El Instituto de Salud Carlos III ha creado y financiado una red de biobancos hospitalarios cuya finalidad es el almacenamiento de muestras para investigación. Esta red de biobancos pretende integrarse en la Red Europea de Infraestructuras en Biobancos y Recursos Moleculares (BBMR), cuyo objetivo es favorecer la realización de estudios en gran escala. Se revisan los principales aspectos, tanto organizativos, como operativos de los biobancos y su relación con los laboratorios clínicos y la investigación biomédica.

© 2010 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Biobank;
Samples;
Tissues;
Plasma;
Biological fluids;
DNA;
RNA

Biobanks, clinical laboratories and biomedical research

Abstract

Biobanks are non-profit public or private institutions for the collection, processing, storage and distribution of human biological specimens, linked to associated data of those samples. The Instituto de Salud Carlos III has set up and funded a hospital biobank network focused on the storage of samples for research. This network is expected to integrate into the Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure (BBMR) whose objective is to favour large-scale studies.

The main organisational and operational aspects of biobanks are reviewed as well as their relationship with clinical laboratories and biomedical research.

© 2010 AEBM, AEFA and SEQC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: buitrago@usal.es (J.M. González-Buitrago).

Introducción

Las colecciones de muestras biológicas son una herramienta esencial para el avance de la investigación biomédica, tanto la experimental como la clínica. Los biobancos son instituciones públicas o privadas sin ánimo de lucro dedicadas a la recogida, el procesamiento, el almacenamiento y la distribución de especímenes biológicos humanos, junto con los datos asociados a esas muestras. Los biobancos, considerados como infraestructuras que agrupan colecciones de muestras, son fundamentales para el avance del conocimiento científico en el área de la biomedicina. Una gran parte de nuestro conocimiento biomédico actual se ha obtenido con la ayuda de colecciones de muestras que han proporcionado el material necesario sobre el que validar, en muestras de origen humano, los resultados experimentales llevados a cabo en los laboratorios de investigación biomédica. La creación de los biobancos ha generado nuevos aspectos éticos y legales importantes con relación al consentimiento informado, la confidencialidad, la propiedad del material biológico y la información con él relacionada, el acceso al banco, los intereses comerciales y los usos discriminados de los resultados de la investigación¹. En esta revisión se consideran los principales aspectos tanto organizativos como operativos de los biobancos y su relación con los laboratorios clínicos y la investigación biomédica.

Evolución histórica

El almacenamiento de muestras biológicas se lleva realizando desde hace mucho tiempo. Empleando la técnica de inclusión en parafina descrita en el siglo XIX por Wilhelm His, entre otros, los patólogos almacenan los bloques de parafina donde se encuentran incluidas las muestras o las preparaciones ya teñidas por si es necesaria su revisión posterior o su comparación con otras preparaciones. Este tipo de almacenamiento se efectúa a temperatura ambiente y a partir de estas primeras colecciones surgen los bancos de tumores.

El almacenamiento de las muestras líquidas y sólidas sin incluir en parafina se produjo más tarde. Eran necesarios congeladores que alcanzaran temperaturas de ultracongelación para preservar adecuadamente las muestras y con una capacidad de almacenamiento lo suficientemente grande como para que fueran útiles en los servicios hospitalarios. A partir de este momento comenzó el almacenamiento de muestras congeladas, entre ellas el suero, lo que dio origen a las serotecas que hoy conocemos. En los laboratorios clínicos tiene dos usos principales. Por un lado, se utilizan cuando es necesario comprobar el resultado de alguna magnitud ya medida o cuando quiere realizarse alguna determinación no hecha previamente. Por otro, se dispone de una colección de muestras que permite analizar parámetros nuevos y evaluar su utilidad clínica.

El principal problema con estas colecciones de muestras es que en la mayoría de las ocasiones no se recogen datos epidemiológicos del paciente, los datos recogidos, tanto clínicos como epidemiológicos, no se recopilan de forma adecuada y, además, suelen recogerse sin que el paciente

haya sido informado y, por supuesto, sin el documento de consentimiento informado.

Biobancos e investigación

De acuerdo con Riegman et al², los biobancos de muestras humanas pueden tener diversos diseños de acuerdo con los posibles objetivos. Se pueden resumir prácticamente en tres tipos principales:

- **Biobancos poblacionales.** Su principal objetivo es obtener biomarcadores de susceptibilidad e identidad de la población y su sustrato operativo es el ADN de la línea germinal de un número muy grande de donantes sanos, representativos de un país/área concreta o cohorte étnica.
- **Biobancos de enfermedades con fines epidemiológicos.** Su actividad se centra en los biomarcadores de exposición, utilizando un número muy grande de muestras, normalmente siguiendo un diseño caso-control y estudiando ADN de la línea germinal o marcadores séricos, asociados a gran cantidad de datos recogidos de los donantes.
- **Biobancos generales de enfermedades.** Se centran en biomarcadores de enfermedad gracias al almacenamiento de colecciones prospectivas o retrospectivas de muestras asociadas a datos clínicos y algunas veces asociadas a ensayos clínicos. Estos datos normalmente no se recogen para un proyecto de investigación concreto, excepto en los ensayos clínicos.

En el año 2009 el Instituto de Salud Carlos III, a raíz de la publicación en el BOE de la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica ha creado y financiado una red de biobancos hospitalarios cuya finalidad es el almacenamiento de muestras para investigación. Esta red de biobancos pretende integrarse en la Red Europea de Infraestructuras en Biobancos y Recursos Biomoleculares (Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure, BBMRI), cuyo objetivo es poner en marcha una red de biobancos en Europa para favorecer la realización de estudios a gran escala, facilitando el acceso a las muestras y los datos relacionados con las mismas a través de los países miembros de la Unión Europea.

Los biobancos de los hospitales tienen como misión fundamental apoyar la investigación tanto de grupos del propio hospital como de otros grupos nacionales o internacionales, recopilando y almacenando diferentes tipos de muestras y los datos asociados que se estimen de interés. Así pues, estas muestras podrán ser utilizadas, además de por los investigadores del hospital, por cualquier grupo nacional o internacional en proyectos de investigación cooperativos, siempre que los fines para los que se soliciten sean exclusivamente de investigación y de interés científico. El biobanco debe disponer de un impreso de solicitud de muestras en el que conste el título del proyecto, el investigador principal, una descripción detallada del proyecto con indicación de los parámetros que se van a analizar y la duración y fuentes de financiación. La solicitud será evaluada por los comités éticos y científicos del biobanco de los que depende su aprobación.

Componentes fundamentales de un biobanco

De una manera genérica, el funcionamiento de un biobanco se basa en los siguientes procesos:

- Sistema de gestión.
- Recogida de las muestras.
- Almacenamiento de las muestras.
- Recogida de datos.
- Almacenamiento de los datos.
- Gestión de la calidad.

Sistema de gestión

El biobanco debe disponer de un sistema de gestión de las muestras que almacena para garantizar su trazabilidad e integridad. Este sistema de gestión puede estar o no certificado por un sistema de certificación entendido este como la acción llevada a cabo por una entidad reconocida como independiente de las partes interesadas, mediante la que se manifiesta que se dispone de la confianza adecuada en que un producto, proceso o servicio debidamente identificado es conforme con una norma u otro documento normativo especificado. El sistema de certificación más frecuente es el ISO y el aplicado en los biobancos, de manera genérica, es el UNE-EN-ISO 9001:2000, aunque se está empezando a plantear la posibilidad de acogerse a la norma UNE-EN-ISO 15189:2007 enfocada a laboratorios clínicos, con los que los biobancos comparten similitudes.

Recogida de las muestras

La organización y el desarrollo de la recogida de las muestras es uno de los aspectos fundamentales de los biobancos. Para ello deben disponer de procedimientos normalizados de trabajo (PNT) que son los documentos escritos que describen la secuencia específica de las operaciones y los métodos que se aplican en el biobanco para una finalidad determinada y proporcionan una manera única según la cual se deben realizar las operaciones cada vez que se repiten. Estos PNT definirán todas las actividades llevadas a cabo en el biobanco, incluyendo, entre otras, el tipo de muestras que pueden ser conservadas, el modo de obtenerlas y cómo conservarlas.

Los principales materiales biológicos humanos que se almacenan son los especímenes de tejidos, células, líquidos biológicos, ADN y ARN.

Tejidos

Las muestras de tejidos se recogen mediante biopsia o en el curso de una intervención quirúrgica. La biopsia puede proporcionar una porción de tejido adicional para el biobanco si el paciente así lo refleja en un consentimiento informado. Este tejido adicional solo se envía al biobanco cuando las muestras principales de la biopsia han proporcionado un diagnóstico inequívoco. El material de biopsia normalmente es una cantidad muy pequeña de tejido.

Durante una intervención quirúrgica, puede ocurrir que se elimine un tejido como parte del tratamiento. Esto sucede en la extirpación de un tumor, la resección de parte de un órgano con una enfermedad inflamatoria o incluso la reparación de un traumatismo. Normalmente, tras revisar la patología para el cuidado del paciente que es el proceso prioritario, queda una cantidad significativa de tejido que puede enviarse al biobanco.

Es fundamental que la muestra de tejido se lleve desde el lugar donde se ha obtenido al lugar donde se procesará lo más rápidamente posible.

Células

Las células pueden obtenerse a partir de tejidos o a partir de los líquidos biológicos. A partir de los tejidos, los principales pasos son la fragmentación del tejido, la digestión con las enzimas específicas, el filtrado de la suspensión celular, el lavado de las células y la formación de la suspensión celular adecuada. Los protocolos dependen del tipo de tejido, pero siguen este esquema básico: una vez obtenida esta suspensión celular, las células que interesen se aíslan mediante centrifugación diferencial o alguna otra técnica física de separación. La obtención de células a partir de líquidos biológicos se suele hacer empleando técnicas de centrifugación.

Líquidos biológicos

Los principales líquidos que pueden almacenarse son: sangre, suero o plasma, orina, líquido cefalorraquídeo, líquidos de cavidades y saliva. Los líquidos biológicos se obtienen de acuerdo con los procedimientos habituales en los laboratorios clínicos³. Uno de los temas controvertidos es si la muestra más adecuada para su almacenamiento es el suero o el plasma. Dado que no existe un protocolo definido, el biobanco debe proceder de manera conservadora al respecto y proceder al almacenamiento de plasma.

ADN y ARN

El ADN y el ARN pueden obtenerse de sangre periférica, biopsias de tejidos u otro tipo de material biológico que posea células nucleadas.

Almacenamiento de las muestras

Las muestras llegan al biobanco en diversos formatos de transporte desde el lugar donde se han obtenido y con distintos requerimientos de almacenamiento.

Tejidos

El formato más habitual para las muestras de tejidos sólidos es el que emplean los servicios de anatomía patológica, en donde la muestra se ha fijado en formol y luego se ha incluido en parafina. El bloque de parafina es útil tanto para la conservación de la muestra como para su manipulación, mediante corte de secciones finas para su tinción y posterior

observación al microscopio. Estas muestras en parafina se almacenan a temperatura ambiente, lo que simplifica enormemente los requerimientos de almacenamiento.

Otro formato común es el tejido que no se ha fijado en formol y que se ha congelado rápidamente. Para ello se incluye el tejido en un compuesto formado por glicoles y resinas solubles en agua que proporciona una matriz adecuada para el corte en el criostato a temperaturas inferiores a -10°C . Este compuesto no deja residuos en las láminas cortadas por lo que impide la aparición de fondo en las tinciones histológicas. Una vez incluido en el compuesto mencionado es necesaria una rápida congelación, por lo que se procede a la inmersión del bloque en un líquido criogénico como el isopentano enfriado a -160°C . Se puede emplear como método alternativo la inclusión del bloque en nitrógeno líquido, aunque este método es menos recomendable por los daños provocados en el tejido. Una vez congelado el tejido se puede almacenar a -80°C en congeladores o a -196°C en nitrógeno líquido.

Líquidos biológicos, ADN y ARN

La forma habitual de almacenamiento de estas muestras es criopreservadas a temperaturas de -80°C – -196°C dependiendo de las posibilidades de almacenamiento con las que cuente el biobanco. A la temperatura del nitrógeno líquido a la presión atmosférica se detienen todas las reacciones bioquímicas por lo que el único factor limitador del tiempo de almacenamiento es la radiación cósmica que puede afectar a la integridad del ADN/ARN. De acuerdo con González Alvaro et al⁴, se ha estimado que este tiempo oscila entre 5.000 y 10.000 años por lo que la congelación a -196°C se considera definitiva.

Crioconservación

Los tejidos con células viables o las células viables que quieran almacenarse para un uso futuro necesitan crioconservarse. El objetivo de las técnicas de crioconservación es alargar el tiempo de almacenamiento reduciendo las demandas metabólicas de las células a bajas temperaturas sin que se pierda su viabilidad debido a la congelación y descongelación. Para la crioconservación se utilizan agentes crioprotectores como el dimetilsulfóxido (DMS) o el glicerol, un medio de cultivo equilibrado y un complemento proteico.

La congelación se hace de forma controlada, disminuyendo la temperatura a una velocidad de $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar -80°C . Los crioprotectores evitan la formación de cristales de hielo intracelulares durante la congelación y equilibran la presión osmótica y la concentración de agua intracelular y extracelular durante la congelación.

Los tejidos crioconservados una vez congelados se almacenan a -80°C en un congelador o a -196°C en nitrógeno líquido.

Recogida de los datos. Consentimiento informado

Hasta hace poco tiempo, la gran mayoría de las muestras que se almacenaban para investigación en los depósitos

hospitalarios se obtenían sin consentimiento informado. Porteri et al⁵ han realizado una propuesta de modelo de consentimiento informado para la recogida, el almacenamiento y la utilización de materiales biológicos con fines de investigación. De acuerdo con estos autores dos reglas principales gobiernan el modelo propuesto:

1. El consentimiento informado debe proporcionar a los donantes una información suficiente para tomar decisiones sobre los usos presentes y futuros de sus materiales biológicos.
2. Debe considerar los fines biológicos y genéticos específicos de la investigación que se va a realizar.

El donante será informado sobre la finalidad de su donación y se le responderá a las dudas que pueda plantear. Se le indicará con claridad que el objetivo de su donación es la investigación biomédica. El modelo de consentimiento informado (CI) cumplirá los requisitos establecidos en la Ley de Investigación Biomédica (LIB) y se establecerán los mecanismos necesarios para garantizar el cumplimiento de los derechos de autonomía de decisión y confidencialidad de los donantes, permitiendo a su vez el uso de las muestras no solo en proyectos de investigación propios del hospital, sino en proyectos de grupos extrahospitalarios, siempre que el proyecto que presenten esté en la misma línea de investigación de esa enfermedad y sea aprobado por los comités científicos y éticos correspondientes. En el caso de los proyectos de investigación internacionales cabe la posibilidad de restringir el uso de las muestras a que en estos proyectos se incluya un grupo de investigación nacional, tal y como se contempla en la actualidad en las normas de cesión de muestras aplicadas por el Banco Nacional de ADN.

Almacenamiento de los datos

La Sociedad Americana de Genética Humana (ASHG)⁶ diferencia entre estudios retrospectivos y prospectivos. Los estudios de investigación retrospectiva emplean muestras existentes que fueron recogidas con un fin diferente al que se presenta en el proyecto de investigación que las solicita al biobanco en el que se encuentran almacenadas. En su mayor parte estas muestras retrospectivas proceden de las colecciones almacenadas en los bancos de tumores. Los estudios prospectivos son aquellos en los que la recogida de nuevas muestras es parte del diseño del estudio. Con independencia del estudio, la ASHG define cuatro tipos de identificación que pueden emplearse para almacenar las muestras:

- Anónimo. Materiales biológicos recogidos originalmente sin identificadores y que es imposible ligarlos con sus orígenes.
- Anonimizado. Materiales biológicos identificados originalmente pero a los que se han borrado de forma irreversible todos los identificadores y es imposible ligarlos con sus orígenes.
- Identifiable. Materiales biológicos no identificados con fines de investigación pero que pueden ligarse a sus orígenes mediante un código. La descodificación sólo puede hacerla el investigador u otro miembro del equipo.

- Identificada. Materiales biológicos que llevan unido los identificadores, como el nombre, el número de paciente u otra localización a la que puede acceder el investigador.

En nuestro país y de acuerdo con la Ley Orgánica de Protección de Datos (LOPD) y su Real Decreto de desarrollo (RD 1720/2007 de 21 de diciembre), los datos de salud son datos personales especialmente protegidos que requieren medidas de seguridad alta, tanto en los archivos informáticos como en los físicos.

Las muestras deben identificarse con un sistema de doble codificación y empleo de un tercer código cuando la muestra se distribuya a los investigadores. Únicamente el responsable del fichero de datos del biobanco podría conocer la ligazón entre los códigos de las muestras. La identidad del donante queda oculta en todo momento a los investigadores e incluso al personal del biobanco.

El biobanco debe contar, de manera ideal, con un sistema de accesos zonales controlados que impida el acceso a sus instalaciones a personas no autorizadas. Adicionalmente, con este sistema se posibilita el registro y seguimiento de las personas autorizadas que acceden al biobanco con el fin de garantizar, de la mejor manera posible, la confidencialidad y seguridad de las muestras y los datos asociados.

Comité Científico Externo

El biobanco debe adscribirse a un Comité Científico Externo (CCE) que puede ser el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del hospital. Además de cumplir el requisito de la LIB de evaluación por comités externos a la institución.

Gestión de la calidad

Los programas de gestión de la calidad tienen como objetivo inmediato que el producto satisfaga unos requerimientos dados, así como garantizar que todos los procesos que se llevan a cabo en el biobanco queden documentados. El biobanco debe establecer un programa de gestión de la calidad de las muestras almacenadas. Este sistema debe cubrir todas las actividades del biobanco, entre ellas la manipulación de las muestras, la seguridad, el registro, el almacenamiento y la distribución de las muestras.

Biobancos de tejidos para trasplante

Dentro del conjunto de biobancos hay instalaciones dedicadas al almacenamiento de tejidos para trasplantes⁷. Los principales tejidos que se almacenan son: piel, hueso, válvulas cardíacas, córneas, tejidos reproductores y tejidos hematopoyéticos. Estos tejidos para los trasplantes tienen dos orígenes principales: los donantes vivos y los donantes fallecidos. La gran mayoría de los huesos, la piel y las válvulas cardíacas que se utilizan para trasplante, así como el tejido ocular, proceden de donantes fallecidos. A diferencia de la donación de órganos sólidos cuya extracción debe hacerse mientras se mantiene la circulación sanguínea, el tejido del donante fallecido puede obtenerse durante las horas posteriores al fallecimiento y hasta 24 h después si se

refrigera el cuerpo. Deben obtenerse muestras de sangre del donante si es posible antes del fallecimiento o si no posmortem para analizarse y detectar la posible infección por VIH, hepatitis B y C, sífilis, en cuyo caso se rechazarán el órgano o tejido.

La piel suele obtenerse de las personas fallecidas y suele emplearse la de la espalda, las piernas o los brazos. Para ello, se desinfecta antes de recogerse y se introduce en medio de cultivo que contiene un antibiótico hasta que se utiliza o hasta que se congela. La piel puede almacenarse a 2–8 °C durante varios días o criopreservarse y almacenarse durante varios años. El hueso se lava para eliminar la sangre, los elementos de la médula y otros tejidos y se introduce en soluciones de antibióticos. Se congela a temperatura entre –60 °C y –150 °C. Las válvulas aórtica y pulmonar se obtienen a partir de los donantes de órganos fallecidos cuando el corazón no puede utilizarse para el trasplante debido a acontecimientos como una parada cardíaca. Se obtienen por disección en el quirófano. Se criopreservan y almacenan en nitrógeno líquido. Las córneas se obtienen en medio estéril y se colocan en un medio de cultivo asimismo estéril. Las corneas se almacenan a 4 °C y deben trasplantarse en 48–72 h.

Los tejidos reproductores (espermatozoides, embriones) se obtienen de los donantes, se criopreservan y se almacenan a –196 °C en nitrógeno líquido. Finalmente, las células progenitoras hematopoyéticas pueden obtenerse de la médula ósea, la sangre periférica o la sangre de cordón umbilical.

Conclusiones

Los biobancos son estructuras fundamentales para la investigación biomédica. La implantación en España de una red de biobancos hospitalarios integrada a su vez en una red europea de infraestructuras de esa categoría va a ser muy importante en el futuro para la realización de estudios a gran escala con un número elevado de muestras solo alcanzable con estas estructuras.

Bibliografía

1. Godard B, Schmidke J, Cassiman JJ, Aymé S. Data storage and DNA banking for biomedical research: informed consent, confidentiality, quality issues, return of benefits. A professional perspective. *Eur J Hum Genet.* 2003;11(Supp 2):S88–122.
2. Riegman PHJ, Morente MM, Betson F, de Blasio P, Geary P. the Marble Arch International Working Group on Biobanking for Biomedical Research. *Mol Oncol.* 2008;2:213–22.
3. González-Buitrago JM. Técnicas y métodos de laboratorio clínico, 3.^a ed. Elsevier Masson; 2010.
4. González Alvaro S, Gómez Gómez FJ, García Delgado I, Chaves Manceras AA. Riesgos de los líquidos criogénicos. *Tecnica Industrial.* 2007;268:32–3.
5. Porteri C, Barry P. A proposal for a model of informed consent for the collection, storage and use of biological materials for research purposes. *Patien Education and Counseling.* 2008;71(1): 136–42.
6. American Society of Human Genetics: ASGH reports. Statement on informed consent for genetic research. *Am J Hum Genet.* 1996;59:471–4.
7. Woll JE. Tissue banking overview. *Clin Lab Med.* 2005;25:473–86.