

Bancos de tumores: papel en la investigación biomédica del presente y el futuro

Pedro L. Fernández, Berta Ferrer y Elías Campo

Servicio de Anatomía Patológica. IDIBAPS. Hospital Clínic. Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica. Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

Resumen

La necesidad de contar con grandes colecciones de tejidos tumorales bien tipificados y congelados para su uso en investigación ha llevado a muchas instituciones a desarrollar la idea de los bancos de tumores que, sin ánimo de lucro pero con evidente necesidad de financiación, se hacen cargo de la obtención, procesamiento, almacenamiento y distribución de muestras a grupos de investigación. Todo lo anterior implica contar con estrictos controles de calidad y seguimiento ético-legal que garanticen un buen servicio a la comunidad científica y el respeto a los derechos de los pacientes donantes. De gran importancia en el desarrollo de estos bancos es la buena coordinación entre los servicios quirúrgicos que extraen los tejidos y los departamentos de anatomía patológica encargados de su gestión.

Palabras clave: Banco de tumores. Cáncer. Matrices de tejido. Microarrays.

TUMOR BANKS: THEIR ROLE IN CURRENT AND FUTURE BIOMEDICAL RESEARCH

The need for large collections of tumour tissues, properly typified and frozen for research, has led many institutions to develop the idea of tumour banks which, although not seeking profit but needing financial support, are in charge of obtaining, processing and storing samples, as well as of distributing them to research groups. This process requires strict quality assurance and the fulfillment of ethical-legal standards to guarantee an effective service to the scientific community and respect for the rights of donor patients. Effective coordination among the surgical services that extract samples and the surgical pathology departments in charge of their management are essential in the development of these tumor banks.

Key words: Tumour banks. Cancer. Tissue microarrays. Microchips.

Introducción

Los grandes avances de la biología molecular durante la pasada década y, más recientemente, la información generada por el Proyecto Genoma, tienen una de sus mayores aplicaciones en el conocimiento de las alteracio-

nes genéticas y moleculares de las enfermedades humanas. Uno de los recursos más importantes para el desarrollo de estos estudios es la obtención de tejidos patológicos y otras muestras (suero, cultivos celulares) procedentes de pacientes afectados de diversas enfermedades, así como los tejidos sanos de control. A partir de estos tipos de muestras es posible obtener ADN, ARN y proteínas útiles para estudios moleculares. La obtención de muestras, su mantenimiento y la distribución a los investigadores interesados constituyen los objetivos básicos de los bancos de tumores (BT), cuya filosofía, como veremos, es sustancialmente diferente de la de los bancos de órganos y tejidos para trasplante¹⁻⁵.

El interés por la creación de BT se ha incrementado en los últimos años, fundamentalmente por las expectativas creadas ante el conocimiento completo del genoma humano y la posibilidad de utilizar muestras humanas normales y patológicas en la investigación biomédica. En particular, está creciendo el interés por el estudio masivo de muestras humanas en la búsqueda de marca-

La elaboración de este trabajo ha sido en parte posible por la financiación de la Red Temática de Investigación Cooperativa de Centros del Cáncer, Instituto de Salud Carlos III, n.º C03/10, la Asociación Española Contra el Cáncer y Fondo de Investigaciones de la Seguridad Social (FIS 01/1519).

Correspondencia: Dr. Pedro L. Fernández Ruiz.
Departamento de Anatomía Patológica.
Hospital Clínic Provincial.
Villarroel, 170. 08036 Barcelona. España.
Correo electrónico: pfernan@clinic.ub.es

Manuscrito recibido el 4-12-2003 y aceptado el 9-1-2004.

dores genéticos relacionados con el diagnóstico molecular, la determinación de polimorfismos relacionados con la susceptibilidad a enfermedades y respuestas a tratamientos. Por otra parte, esta nueva perspectiva está promoviendo la incorporación de tecnología emergente en los bancos de tejidos, como la microdissección de muestras por láser⁶⁻⁸ y la fabricación de matrices (microarrays) de tejidos⁹⁻¹¹. Todo lo anterior se enmarca en el objetivo general de trasladar la información generada por las ciencias básicas moleculares a la medicina asistencial, por lo que se habla de investigación "traslacional".

Además del interés puramente investigador, las muestras almacenadas en los servicios de anatomía patológica están siendo revalorizadas, tras su uso diagnóstico inicial, como fuente de información clínica pronóstica (evolución) y predictiva (respuesta terapéutica). Esto implica que tanto los tejidos fijados e incluidos en parafina como, muy especialmente, los congelados pueden ser requeridos tras el paso de los años para realizar nuevos análisis de los casos clínicos, con una importante repercusión en los pacientes. Así, puede ser necesario acudir a muestras almacenadas en un BT para poder realizar nuevos y sofisticados análisis moleculares que modifiquen conductas terapéuticas o predigan determinados comportamientos de las neoplasias a la luz de nuevas técnicas de evaluación. Un ejemplo de lo anterior es el emergente uso de los microchips de ADN para detectar vías anormalmente activadas o reprimidas en los tumores y que sean susceptibles de actuar como dianas terapéuticas o marcadores diagnósticos^{12,13}.

Objetivos generales de un banco de tumores

Podemos resumir los objetivos generales de un banco de tejidos y tumores en 4 puntos:

1. Crear y mantener una colección completa de muestras de tejidos normales y patológicos, recogidas en condiciones óptimas, para ser utilizados en proyectos de investigación que incluyan su análisis morfológico, fenotípico y molecular.
2. Servir de depósito de muestras congeladas para futuras técnicas de evaluación pronóstica o terapéutica que puedan modificar el manejo clínico de los pacientes.
3. Garantizar la calidad del material almacenado mediante un análisis morfológico de todas las muestras incluidas en el banco, y asegurar su correlación anatomopatológica con el diagnóstico definitivo del tejido.
4. Suministrar sin ánimo de lucro el anterior material a grupos de investigación de la propia institución o ajenos a ésta que cumplan los requisitos científicos y éticos exigibles para el uso de este tipo de muestras.

Un quinto objetivo o servicio que puede aportar un BT, cuando la infraestructura y funcionamiento del servicio que lo alberga lo permitan, podría ser el dar soporte a la obtención de secciones histológicas, preparados y extracciones de ácidos nucleicos o proteínas para aquellos grupos de investigación que lo precisen en el desarrollo de sus propios proyectos.

Tipos de muestras del banco

Los tejidos almacenados en un BT pueden corresponder a muestras de tejidos normales, tumores benignos y malignos, y tejidos con una afección no tumoral, predominantemente inflamatoria e inmunológica, obtenidos a partir de intervenciones quirúrgicas, y en menor proporción autópsicas, que llegan de forma sistemática a los servicios de anatomía patológica de los hospitales. La actividad del banco puede, además, extenderse a la congelación de células normales y patológicas procedentes de sangre, médula ósea, disgregación tisular o derivación de líneas celulares. De igual manera, algunos BT almacenan muestras procedentes de animales de experimentación.

Por último, y aunque no es un objetivo primordial, un BT puede servir también de reservorio de colecciones de ADN y ARN de tejidos tumorales y normales obtenidos de las muestras existentes; éstas son especialmente valiosas, dado el complejo procesamiento que han seguido y la necesaria coordinación con un laboratorio de biología molecular.

La obtención de las muestras a partir de especímenes quirúrgicos para ser depositadas en el banco debe seguir una priorización que cumpla los criterios establecidos por la Comisión de Tejidos y Comité Ético de cada hospital para la manipulación y selección de todas las muestras tisulares extirpadas a los pacientes. En general, los objetivos prioritarios en la obtención de una muestra quirúrgica deben ser:

1. Diagnóstico.
2. Pronóstico.
3. Investigación.

Por tanto, no debemos olvidar que, bajo ningún concepto, el estudio anatomopatológico de la muestra puede ponerse en riesgo para obtener tejido para la investigación.

Métodos de procesamiento y preservación de muestras

Hay procedimientos normalizados para el manejo de las muestras que se incluyen en el banco. Sin embargo, la recogida y el procesamiento de éstas podría adaptarse a los requerimientos individuales de los investigadores. La mayor parte del material de un BT está congelado para su preservación, ya que la fijación química (formol, alcohol, etc.) hace que pierda importantes cualidades estructurales. Por ello, resulta de capital importancia la pronta llegada de los especímenes a los servicios de anatomía patológica, donde el patólogo hará una selección inmediata de las muestras a congelar y se comenzará su procesamiento. En ocasiones especiales, la toma de muestras se realiza en el mismo quirófano donde se extrae el órgano, en un intento de minimizar la degradación por isquemia y autólisis, lo que es de especial relevancia para los estudios de ARN. Siempre que sea posible, es necesario no limitarse a tomar tejido tumoral o patológico, sino también su equivalente normal para poder realizar análisis comparativos.

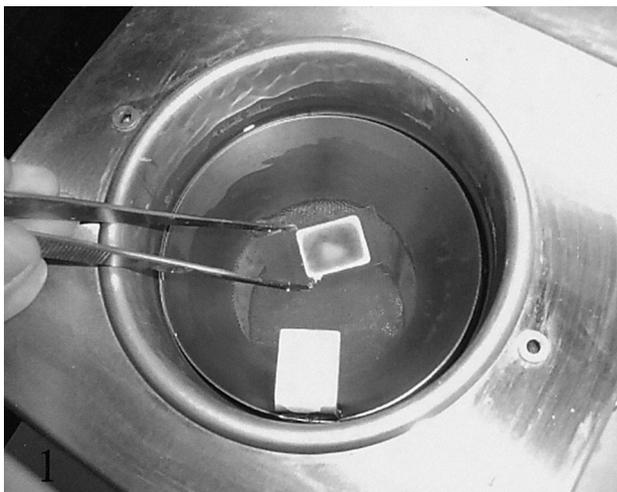


Fig. 1. Congelación de muestra en criomolde con OCT y baño de isopentano.

A continuación describimos las fases del procesamiento tras la selección macroscópica y toma del tejido.

Congelación

Las muestras obtenidas de los órganos o tumores se congelan habitualmente en isopentano frío o nitrógeno líquido en pequeños baños o contenedores por inmersión directa o incluidos en un medio criosolidificable (OCT-Compound, Tissue-Tek 4583, Bayer SA) (CT) (fig. 1). Esto último permite la confección de bloques susceptibles de ser cortados de forma inmediata en criostatos para controlar la naturaleza y calidad de cada muestra. Cuando el material consiste en fragmentos congelados sin medio, se suelen almacenar en pequeños tubos de 1-2 ml especiales para criopreservación (fig. 2).

Almacenamiento

Habitualmente, las muestras se almacenan en contenedores de nitrógeno líquido o en congeladores de -80°C . Es conveniente recalcar la necesidad de disponer de sistemas de seguridad que impidan la pérdida irreparable del material de un banco por problemas tales como pérdida de conexión eléctrica, consumo total del nitrógeno, fallos mecánicos, etc. Para ello, son imprescindibles los sistemas de alarma de temperatura, a ser posible conectadas a una central de vigilancia, suministros de electricidad dobles, suministros de nitrógeno líquido con depósitos de reserva o, incluso, contar con lugares de almacenamiento adecuado de reserva.

Dentro de los arcones o congeladores, las muestras se suelen organizar en cajas, a su vez distribuidas en estanterías verticales u horizontales (*racks*).

Es evidente la necesidad de un poderoso y ágil sistema de identificación de la gran cantidad de muestras que se generan, para lo que resultan útiles los



Fig. 2. Molde con tejido congelado en OCT y tubo de criopreservación sin OCT.

sistemas de código de barras o puntos y lectores láser, si bien los humildes sistemas de etiquetado y rotulado numérico prestan por el momento grandes servicios. Indisoluble del anterior, se requiere un almacenamiento de información en bases de datos que gestionen el contenido del banco (localización de la muestra, cantidad, consumo, tipo de tejido, diagnóstico, etc.). En este momento conviene resaltar la previsible controversia que se suscitará a corto plazo sobre la necesidad del anonimato de muestras, lo que es inviable en su forma absoluta si se pretenden hacer estudios de seguimiento clínico de los pacientes de los que proceden.

Distribución

Tras ser solicitadas por el investigador y una vez autorizado su envío por el correspondiente comité de ética de la institución, las muestras se remiten de tal manera que no se rompa la cadena del frío, habitualmente en cajas aislantes con hielo seco o en contenedores de nitrógeno líquido.

Control de calidad y bioseguridad

Todos los tejidos depositados en un banco deben ser analizados histológicamente, donde se establecerá con precisión el diagnóstico patológico y se asegurará que el tejido finalmente congelado representa tejido viable real (se descartan aquellos tejidos necróticos o de escasa preservación histológica). El control de calidad de las muestras abarca las diferentes fases de su adquisición, procesamiento, almacenamiento y distribución, y puede resumirse en:

1. Calidad del material tisular: diagnóstico histopatológico comprobado del resto del tumor procesado de forma sistemática, representatividad del material congelado (estudio directo del tejido congelado), proceso de conge-

lación poco destructivo y sistemas de seguridad de los equipos de almacenamiento, mantenimiento de la antigenicidad tisular, preservación de la integridad de los ácidos nucleicos, envío de muestras en condiciones que aseguren el estado de congelación, etc.

2. Calidad de la información asociada a las muestras: adecuada identificación de éstas (códigos de barras o numéricos indelebles), introducción correcta de datos en la base informática, suficientes campos informativos en la anterior, mantenimiento de anonimato, acceso restringido a los datos, etc.

Respecto a los riesgos que comporta la manipulación de los tejidos, cabe señalar que, como norma general, no deberían incluirse en un BT muestras con reconocida capacidad infectocontagiosa. Dada la imposibilidad de conocer este extremo en todas las muestras, un banco de estas características difícilmente puede hacerse responsable de la posible infectividad del material suministrado ni puede garantizar su esterilidad, por lo que en todo momento deben observarse las precauciones necesarias para el manejo de muestras biológicas.

Otras actividades de los bancos de tumores

Los BT, debido a su habitual dependencia de los servicios de anatomía patológica, pueden proporcionar, en coordinación con estos servicios, secciones histológicas, tanto de material congelado como del material incluido en parafina, dado que éstas son técnicas que requieren la participación de personal cualificado y una infraestructura adecuada (criostatos, microtomos), de la que habitualmente no disponen la mayoría de equipos de investigación biomédica.

Aunque tampoco son actividades específicas de un BT, la existencia de colecciones tisulares organizadas y con procesamiento estandarizado, unido a la necesaria asociación a los servicios de anatomía patológica, pueden ampliar el ámbito de suministro de muestras al asociarse a unidades de "microdissección tisular con láser" y de fabricación de matrices de tejido, lo cual hemos logrado en nuestra institución con notable éxito. La primera de estas técnicas consiste en el aislamiento de células de secciones histológicas o cultivos mediante un láser de alta resolución dirigido mediante un ordenador bajo control microscópico. La muestra se captura mecánicamente o por "catapultamiento" por energía y se transfiere a un tubo de ensayo. Esta estrategia ha demostrado ya su utilidad en la disección de muestras de hasta 7 µm de diámetro y en la obtención de ADN, ARNm y proteínas, y permite analizar las alteraciones genéticas y la expresión de genes en poblaciones homogéneas de células evitando la "contaminación" por otros componentes tisulares. Por otro lado, la creciente miniaturización de los estudios moleculares, que permite el análisis de miles de genes a la vez por medio de "microchips" de ácidos nucleicos, ha llevado al desarrollo de sistemas similares de organización y miniaturización de matrices que permiten optimizar y acelerar los estudios de expresión de genes en tejidos de forma simultánea e incluyendo un número variable de muestras que va de decenas a más de mil sobre un mismo portaobjetos de cristal (fig. 3).

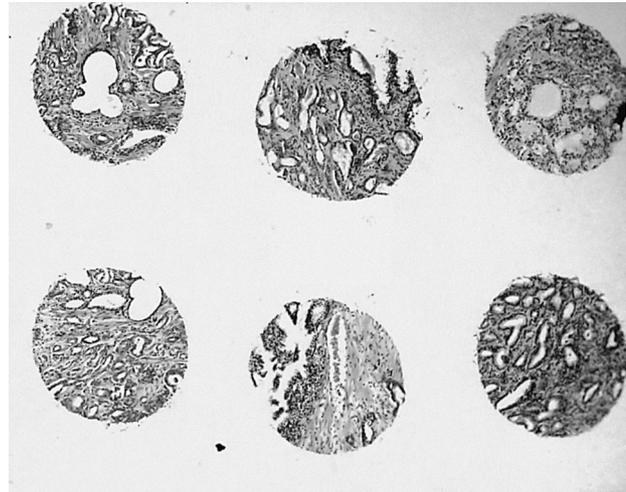


Fig. 3. Sección histológica de bloque con múltiples muestras (matriz o microarray de tejido). HE, x 40.

Consideraciones éticas y legales

Trabajar con tejidos humanos y su almacenamiento para posibles tareas de investigación plantea de forma inmediata una gran variedad de problemas de índole ética y legal¹⁴. Una de las cuestiones más importantes es la necesidad o no de autorización específica por parte de los pacientes para el uso de un material que es excedente del que se le extirpa para el diagnóstico. De requerirse tal consentimiento, la mayor parte de las muestras existentes en la actualidad en los diferentes bancos serían inútiles, dada la imposibilidad de contactar con todas esas personas, muchas de las cuales habrán fallecido por sus procesos tumorales, y obtener los documentos en un período razonable. Esta cuestión debe plantearse y resolverse de forma inmediata si se pretende la viabilidad de este tipo de servicios. En lo que respecta a una visión prospectiva del problema, es necesario considerar, en coordinación con los comités éticos locales, la inclusión de alguna cláusula en alguno de los documentos de consentimiento que los pacientes firman en los hospitales que recoja la posibilidad de usar los excedentes de sus tejidos para investigación y docencia.

Países como Estados Unidos han sido pioneros en desatar una gran polémica sobre la necesidad de anonimato de las muestras que garantice la privacidad de los datos obtenidos de ellas. Esto plantea para el investigador grandes problemas en su labor, como son la necesidad de contar con un ente que garantice tal anonimato al gestionar los datos del paciente y eliminar toda posibilidad de asociación de la identidad del sujeto con la de las muestras. A ello se une la imposibilidad de realizar estudios de seguimiento que implican un contacto con el paciente o su historia clínica y que tan indispensables son en investigación clínica. Como alternativa, se empieza a considerar la posibilidad de un anonimato parcial, de manera que sea difícil, pero no imposible, la identificación del paciente-muestra bajo circunstancias especiales y con un control por determinados comités que vigilen el

respeto a los derechos del paciente y la justificación de esa pérdida del anonimato.

Otro aspecto importante es el mantenimiento económico de los bancos, que deben financiar a un personal, adquirir-amortizar equipos y reponer material fungible, para lo que hasta ahora no se solían dedicar partidas presupuestarias en los hospitales. Esto, unido a la creciente necesidad de autofinanciación, plantea la cuestión de requerir a los grupos de investigación que solicitan muestras que colaboren económicamente en su preparación, gestión y envío, lo que no debe tomarse como una facturación por su adquisición, aspecto éste que sería éticamente reprobable y legalmente perseguible.

A diferencia de lo que ocurre con los bancos de tejidos para trasplantes, no parece haber en nuestro país una legislación específica para los BT que solucione algunos de los problemas anteriores.

Finalmente, y dada la necesidad de poder ofrecer la gran variedad posible de muestras tisulares al mayor número de grupos posible y de la forma más eficiente, resulta evidente que los actuales y futuros BT que se organicen habrán de coordinarse de una u otra manera, tanto regional como nacional e internacionalmente. En este sentido, es de gran importancia la iniciativa promovida por la Red Temática de Investigación Cooperativa de Centros de Cáncer (RTICCC), financiada por el Instituto Carlos III, que pretende coordinar diversas redes de BT entre las que destacan por su tamaño y tradición las promovidas por el Centro nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) y las redes de BT de Cataluña y Castilla y León.

Papel de los servicios de cirugía en los bancos de tumores

Es obvio que, especialmente los servicios de cirugía, pero también otras unidades hospitalarias que realizan tomas de tejidos, son los proveedores habituales de casos a los BT, de ahí que resulte fundamental su implicación en su desarrollo y mantenimiento. Su papel es de la máxima importancia en la obtención rápida y el envío adecuado a los servicios de anatomía patológica, donde se procederá a la extracción de muestras. Este envío debe ser lo más rápido posible, para lo cual se puede utilizar el mismo circuito que para las biopsias intraoperatorias que son, por tanto, un material ideal para la obtención de tejido en las mejores condiciones. Las muestras deben remitirse en fresco a temperatura ambiente o refrigeradas, y no sumergidas en suero o cualquier otro fluido

que entorpezcan la congelación. En casos excepcionales que requieran una gran rapidez de procesamiento, se podría requerir que personal entrenado del servicio de anatomía patológica actuara sobre las muestras en el mismo quirófano.

Para asegurar la valiosa colaboración de los servicios quirúrgicos, éstos han de ser conscientes de su imprescindible papel en el desarrollo de estos bancos; para ello deben comprender que son no sólo proveedores necesarios, sino posibles beneficiarios del uso de este material para la investigación en sus propios proyectos. A ello ha de añadirse el cada vez más probable uso de las muestras de los BT para el beneficio diagnóstico o terapéutico de los pacientes que, con el desarrollo de nuevas técnicas de análisis, puedan necesitar retrospectivamente el estudio de sus tejidos congelados.

Bibliografía

1. Naber SP, Smith LL, Wolfge HJ. Role of the frozen tissue bank in molecular pathology. *Diag Mol Pathol* 1992;1:73-9.
2. Naber SP. Continuing the role of a frozen-tissue bank in molecular pathology. *Diag Mol Pathol* 1996;5:253-9.
3. Haimowitz MD. Practical issues in tissue banking. *Am J Clin Pathol* 1997;107(Suppl):S75-81.
4. Kant JA, Sobel M. Genetic research using archival samples: an uncertain future? *Mol Diag* 1996;1:79-82.
5. Becich MJ. The role of the pathologist as tissue refiner and data miner: the impact of functional genomics on the modern pathology laboratory and the critical roles of pathology informatics and bioinformatics. *Mol Diag* 2000;5:287-99.
6. Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, et al. Laser capture microdissection. *Science* 1996;274:998-1001.
7. Fink L, Seeger W, Ermert L, Hanze J, Stahl U, Grimminger F, et al. Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med* 1998;4:1329-33.
8. Luo L, Salunga RC, Guo H, et al. Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. *Nat Med* 1999;5:117-22.
9. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärland M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumour specimens. *Nat Med* 1998;4:844-7.
10. Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, Gasser T, et al. High-throughput tissue microarrays analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 1999;154:981-6.
11. Fernández PL, Nayach I, Fernández E, Palacín A, Campo E, Cardesa A. Tissue macroarrays ("microchips") for gene expression analysis. *Virchows Arch* 2001;438:591-4.
12. Chung CH, Bernard PS, Perou CM. Molecular portraits and the family tree of cancer. *Nat Genet* 2002;32(Suppl):533-40.
13. Guo QM. DNA microarray and cancer. *Curr Opin Oncol* 2003;15:36-43.
14. Oosterhuis JW, Coebergh JW, Van Veen E-B. Tumour banks: well-guarded treasures in the interest of patients. *Nat Rev* 2003;3:73-7.