

TEJIDOS NEUROMUSCULARES: BANCO DE CEREBROS



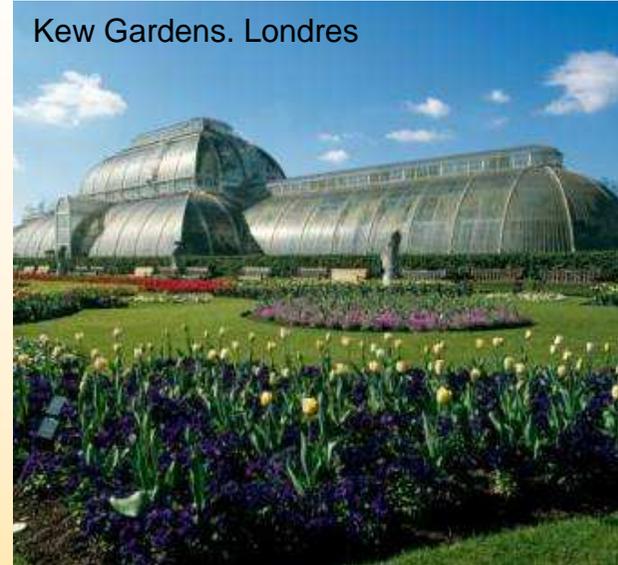
Dra. Nuria Terán Villagrà
Servicio de Anatomía Patológica
Hospital Txagorritxu

BANCOS DE TEJIDOS BIOLÓGICOS

Museo Entomológico de Palmira
Colombia



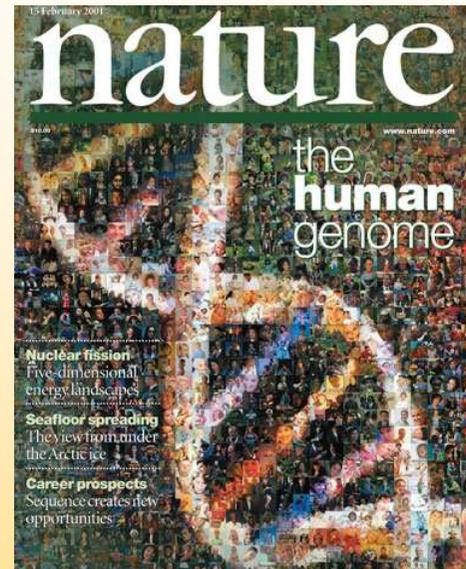
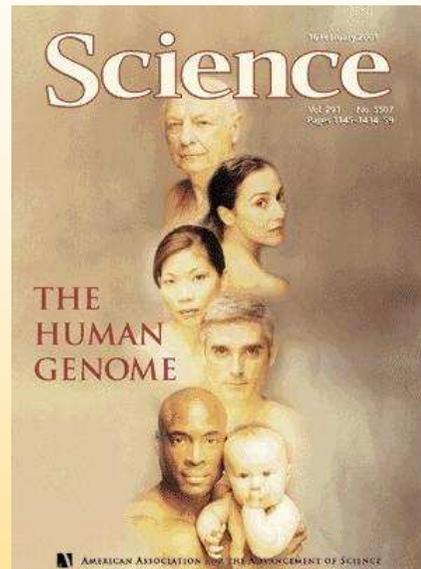
Kew Gardens. Londres



Antropología forense. Bogota

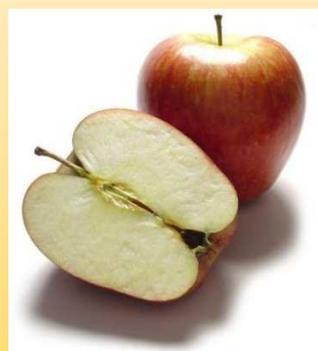
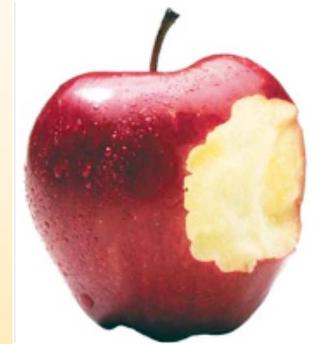
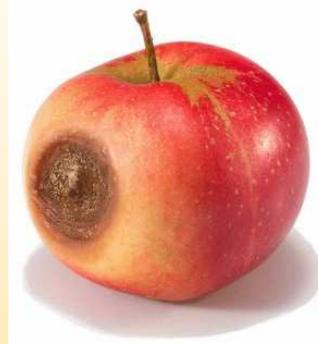


El porqué de la creación de los biobancos de material humano



- Hace mas de 15 años: Proyecto Genoma Humano
- Medicina postgenómica
- Interacciones genéticas y ambientales
- Criterios diagnósticos y pronósticos
- Nuevas estrategias terapéuticas

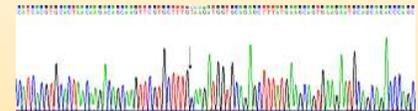
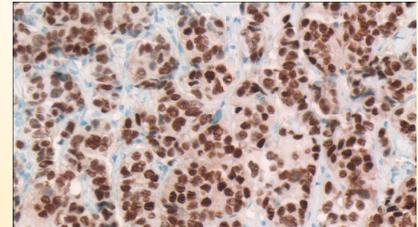
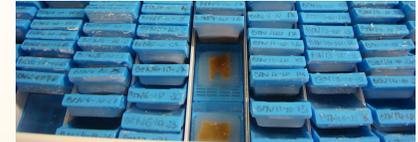
El porqué de la creación de los biobancos de material humano



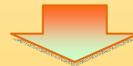
MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS

Muestras humanas para diagnóstico

- ✓ Pj. El tejido del tumor de mama que se guardaba era solo el dedicado al estudio diagnóstico del momento.
- ✓ En los 80 incorporación de la determinación de receptores hormonales → utilización del tejido guardado para completar el estudio de los casos ya diagnosticados
- ✓ Cáncer y genética → necesidad de tejido congelado



Preservación del tejido en diferentes medios
realización de estudios actuales y también futuros

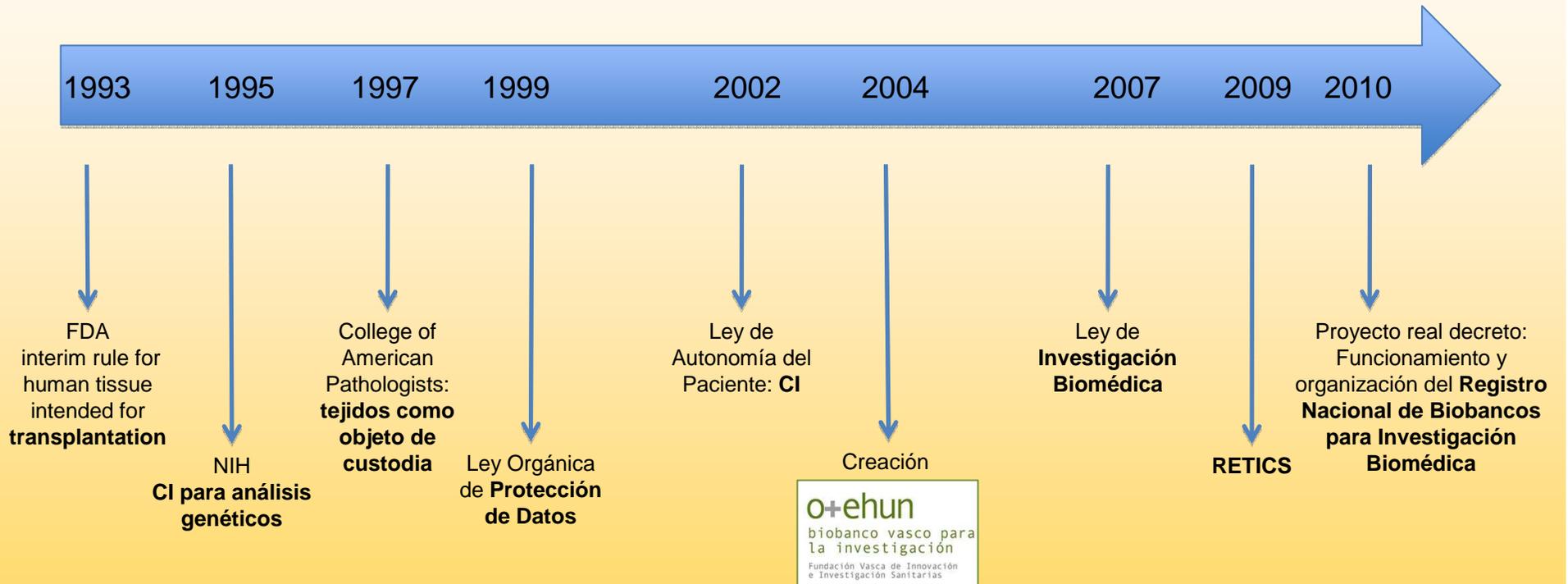


**DIAGNOSTICO
PRONOSTICO
TRATAMIENTO**

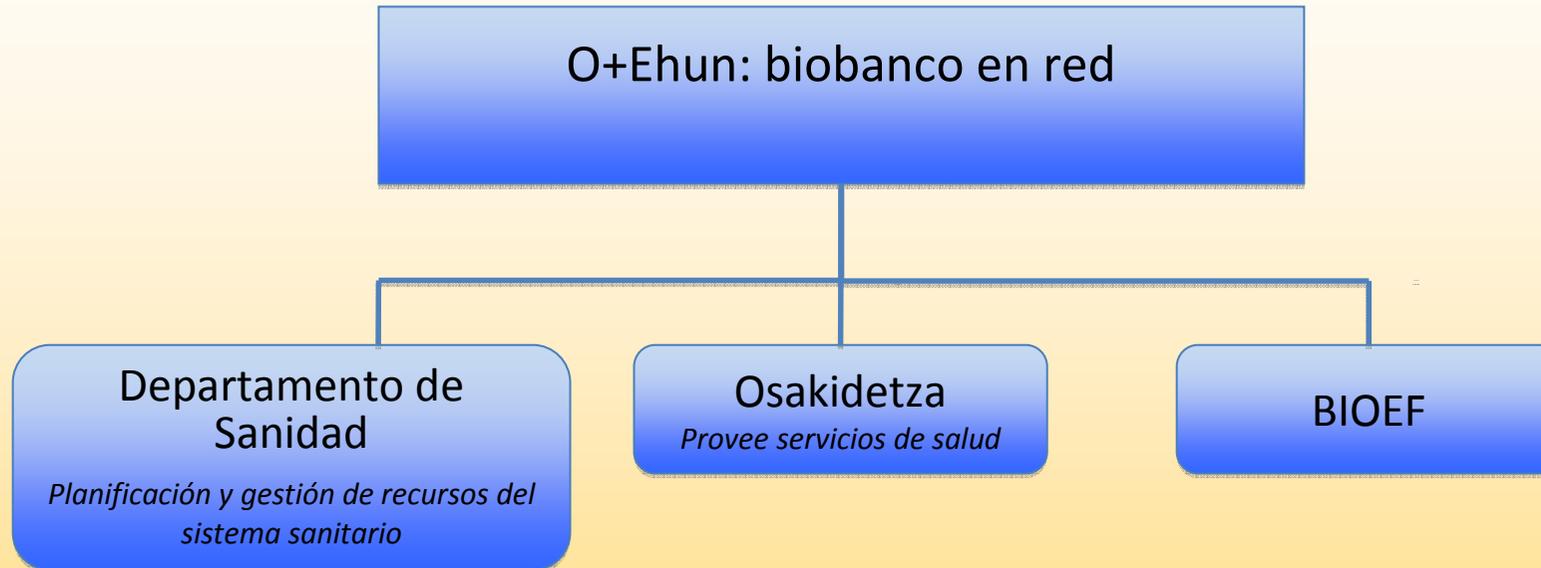
La gran cantidad de material biológico de pacientes
contribuye a crear un nuevo recurso para la
investigación biomédica

MUESTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS

Historia sobre gestión de muestras



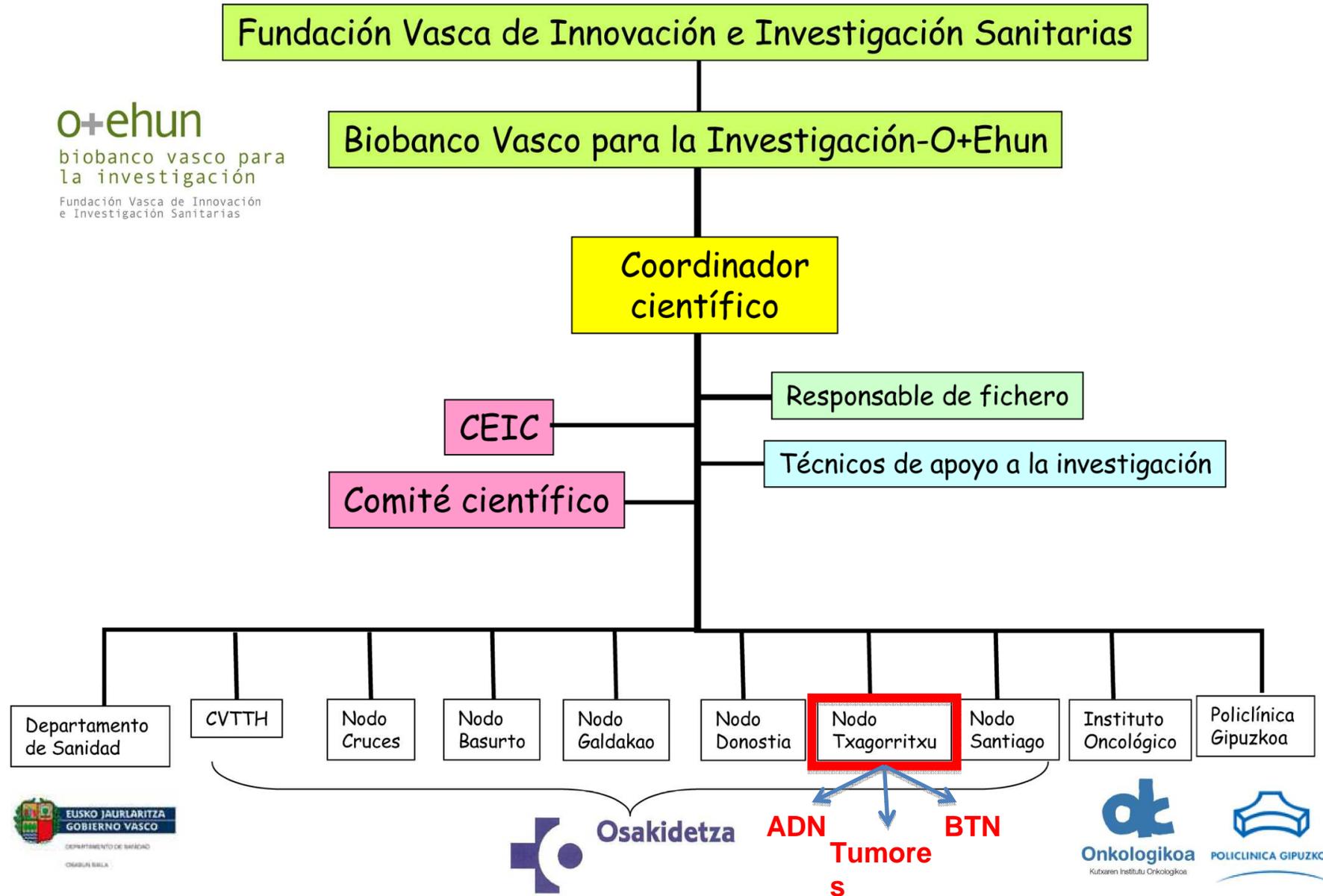
2004: CREACION DEL BIOBANCO



BOPV Orden 21 de febrero 2003:

MISIÓN de O-Ehun ser *un instrumento que permita al Sistema Sanitario de Euskadi el desarrollo de investigación avanzada en biomedicina y biotecnología, mediante la gestión de muestras biológicas clasificadas*

ORGANIGRAMA DE O+Ehun



NODO TXAGORRITXU

Banco de ADN y tumores

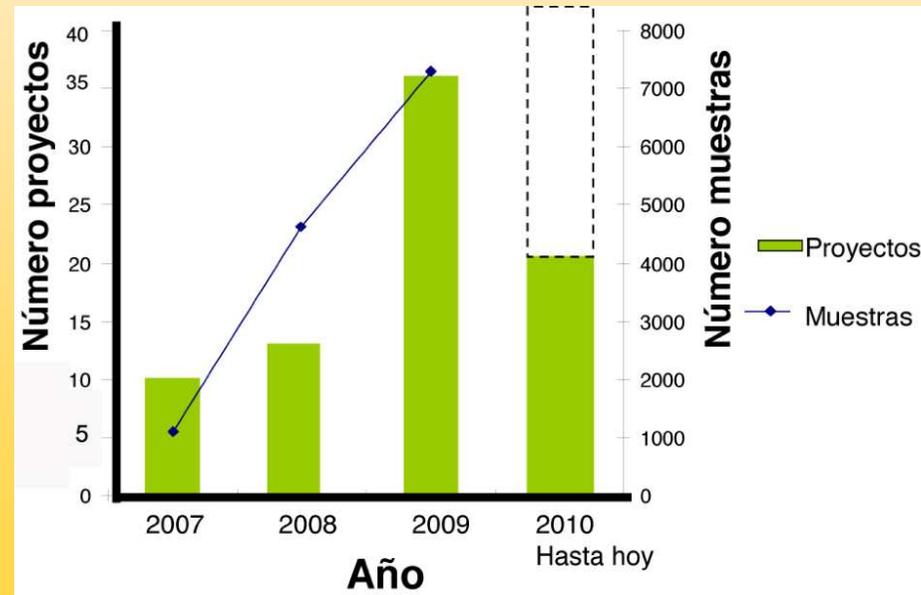
Biobanco de ADN

- 9 investigadores depositarios
- 14 proyectos abiertos
- 350 donantes
- > 4000 muestras (sangre, plasma, suero, linfocitos, ADN, ARN, etc...)

Biobanco de tumores

- 325 donantes
- Muestras de tejido tumoral y sano

ACTIVIDAD DEL BIOBANCO VASCO



NODO TXAGORRITXU

Banco de Tejidos Neurológicos

Impacto social y económico

La investigación en tejido neurológico humano es una línea prioritaria de la investigación medica moderna

- Las enfermedades neurológicas suponen un 35% de la patología en Europa, según la OMS
- Supone 386 billones de Euros
- Progresivo envejecimiento poblacional
- Ausencia de modelos animales que clarifiquen la etiopatogenia de las enfermedades neurodegenerativas y la dificultad de cultivar tejido nervioso primario
- Necesidad de caracterizar molecularmente las enfermedades neurodegenerativas
- Establecimiento de correlaciones clínico-patológicas y genéticas
- Necesidad de tejido control preservado con garantía de calidad

Focos de actividad neuropatológica



- ✓ **Estudio de mecanismos moleculares patogénicos INICIALES de las enf. neurodegenerativas**
- ✓ **Desarrollo de estrategias DIAGNOSTICAS Y TERAPÉUTICAS**

NODO TXAGORRITXU, BTN

Necesidades logísticas

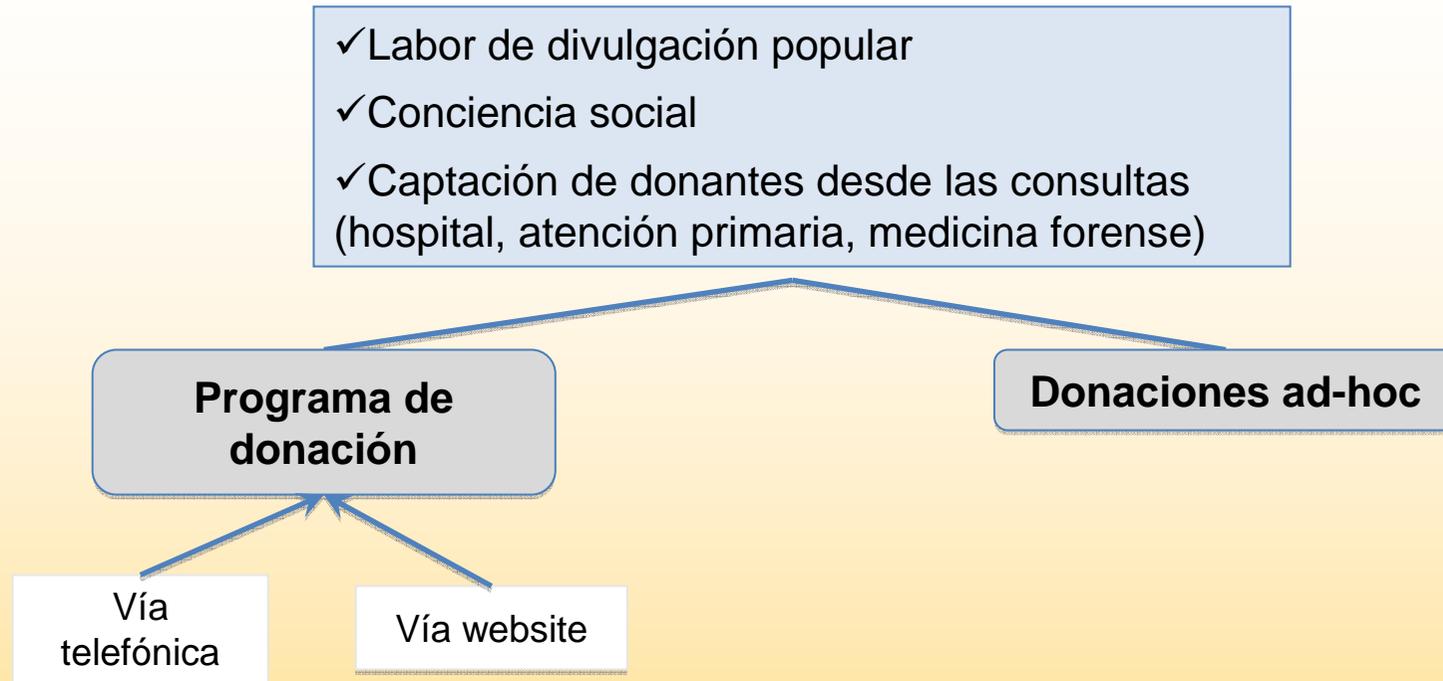
Habitáculo	Laboratorio Sala de autopsias Sala de frío	Osakidetza
Infraestructura	Microtomo, criostato, teñidor e inmunoteñidor, molecular Frigorífico, ultracongeladores,	BIOEF
Fungible	Tinciones Anticuerpos Procesado de muestras (fluorescencia, ME, MO, molecular, etc..) Extracción ADN, ARN, proteínas	BIOEF
Recursos humanos	Neuropatólogo (diagnóstico, neuroanatomía, manipulación de tejidos para distintas técnicas, microdisección, etc..)	Osakidetza
	Técnico de laboratorio (formación específica en técnicas de neuropatología, procesamiento de muestras para fluorescencia, ME, molecular.....)	BIOEF
	Secretaria (Informes, solución de dudas, protocolos de recepción y envío de muestras, etc...)	Osakidetza
	Neurólogo consultor (Seguimiento de donantes y análisis de datos clínicos)	Osakidetza
Recursos informáticos	Plataforma informática del biobanco, Sistema operativo específico para el BTN Ordenador, scanner, impresora	BIOEF

NODO TXAGORRITXU, BTN

Diseño

1. Programas de captación de donantes
2. Diseño del proceso para la gestión de muestras y diagnóstico
3. Confección de la plataforma informática
4. Control de calidad
 - Indicadores de proceso
 - Indicadores de resultado

1. PROGRAMA DE DONACION DE CEREBROS



- Atención telefónica para posibles dudas
- Responder a solicitudes de donación
- Citar a los potenciales donantes, informar y recoger los consentimientos
- Seguimiento clínico de los donantes con y sin patología
- Recogida sistemática de muestras de sangre, pruebas de imagen, test cognitivos...

Cerebros patológicos y controles
Seguimiento clínico detallado

1. PROGRAMA DE DONACION DE CEREBROS

Principales objetivos

1. Facilitar las donaciones de cerebros mediante un programa ético y legalmente aprobado de consentimiento informado para estudios de cohortes predefinidos y también donaciones ad-hoc
2. Aportar el diagnóstico patológico a los familiares de los donantes según los últimos protocolos de diagnóstico internacionales
 - Consejo genético
 - Estudio de agregación familiar
3. Cuidar el contacto con los familiares, informándoles sobre el el progreso de los resultados científicos del biobanco.
 - A través de las pagina web
 - Correo electrónico

1. PROGRAMA DE DONACION DE CEREBROS

Modelo de consentimiento informado

INFORMACION PARA LA EXTRACCION POSTMORTEM Y DONACION DE MUESTRA BIOLÓGICAS RELACIONADAS CON EL SISTEMA NERVIOSO AL BIOBANCO VASCO PARA LA INVESTIGACIÓN

Responsable clínico: Dr.
Centro/Hospital:

A USTED, D/Dña.....
como familiar o responsable legal de D/Dña.....

fallecido el día..... de de 201.....

SE LE SOLICITA su aprobación para la extracción de tejido cerebral y/o muestra de médula espinal así como otros tejidos relacionados con el sistema nervioso para su posterior almacenamiento en el **Biobanco Vasco para la Investigación** de la Fundación Vasca de Innovación e Investigación Sanitaria (BIOEF). El objetivo es que estas muestras biológicas puedan ser conservadas y destinadas a futuras investigaciones biomédicas relacionadas con las neurociencias.

FINALIDAD DEL DEPÓSITO DE LAS MUESTRAS EN EL BIOBANCO VASCO PARA LA INVESTIGACIÓN

Un biobanco es un centro de conservación en condiciones adecuadas de muestras (tejidos, ADN y otros derivados) que representan un valioso instrumento con destino a la Investigación de enfermedades y que puede permitir la obtención de conocimientos que sirvan para el desarrollo de nuevas estrategias y terapias aplicables a pacientes. El Biobanco de BIOEF está constituido en nodos, uno de los cuales está ubicado en el Hospital Txagorritxu en donde se almacenarán las muestras extraídas.

BENEFICIO Y ATENCIÓN MÉDICA

La donación de muestras para Investigación es voluntaria y altruista. La donación de tejidos para la investigación ofrece al donante la satisfacción de saber que colabora en el avance de la medicina en beneficio de la sociedad. La muestra recogida no podrá ser objeto directo de actividades con ánimo de lucro. No obstante, la información generada a partir de los estudios realizados sobre la muestra extraída podría ser fuente de beneficios comerciales. En tal caso, están previstos mecanismos para que estos beneficios reviertan en la salud de la población, aunque no de forma individual en sus familiares.

INFORMACIÓN SOBRE LA OBTENCIÓN Y UTILIZACIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

El procedimiento de extracción del tejido nervioso se llevará a cabo en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Txagorritxu. Los tejidos se procesarán según los protocolos establecidos y se incorporarán al Biobanco, dónde se conservarán para su uso con fines de investigación. Una vez realizada la extracción, se restaurará el cuerpo del donante hasta lograr su apariencia inicial.

DESTINO DE LA MUESTRA Y CESIÓN A OTRAS LINEAS DE INVESTIGACIÓN

El Biobanco Vasco para la Investigación procesará la muestra y los datos clínicos relevantes de su familiar que serán registrados empleando un procedimiento de encriptación y codificación para garantizar la protección de la identidad.

Sólo el responsable clínico de esta donación podrá relacionar estos datos con su familiar.

Firmando el documento, las muestras así conservadas se podrán ceder para la realización de proyectos de investigación en el ámbito de las neurociencias. Estos proyectos de investigación serán aprobados por un Comité de Ética de la Investigación, y, la cesión de la muestra para los fines será informada favorablemente por los comités ético y científico externos del biobanco, en cumplimiento de las exigencias éticas y legales. En este caso, el Biobanco únicamente transferirá a los investigadores la muestra y los datos clínicos relevantes asociados de manera codificada. Ni los investigadores, ni el Biobanco en ningún caso tendrán acceso a la identidad del donante. Un dato es codificado cuando se ha sustituido o desligado de la identidad de la persona mediante un código, el cual permita la operación inversa.

Si usted prefiere que nunca nadie pueda recobrar la relación entre las muestras y su familiar, puede optar por su conservación anonimizada, de manera que no sea posible unirle en el futuro a su identidad. En este caso, al realizar la anonimización se romperá irreversiblemente todo vínculo que permita relacionar las muestras y los datos clínicos almacenados con los datos identificativos.

Tanto el Biobanco Vasco para la Investigación, como el investigador al que en un futuro se puedan ceder las muestras, son responsables del manejo de los datos, conforme a la Ley orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, sobre Protección de Datos de Carácter Personal. Asimismo se dará cumplimiento a los requerimientos de la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, y la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.

El Hospital Txagorritxu garantiza que en ningún caso saldrá del centro dato alguno de carácter personal tanto si se utiliza la anonimización como la codificación.

Los resultados de futuros estudios podrán ser comunicados en reuniones científicas, congresos médicos o publicaciones científicas. Siempre se mantendrá una estricta confidencialidad sobre la identidad de su familiar.

ACCESO A LAS MUESTRAS Y/O LA INFORMACIÓN

El acceso a la información derivada del análisis genético del fallecido por parte de los familiares biológicos se limitará a los datos genéticos pertinentes para la protección de su salud, siempre que así lo deseen y no haya realizado la anonimización.

1. PROGRAMA DE DONACION DE CEREBROS

Modelo de consentimiento informado



The image shows the cover of a consent form. It features the logos of 'o+ehun' (biobanco vasco para la investigación) and 'Osakidetza'. The title in the center is 'AUTORIZACIÓN PARA EXTRACCIÓN POSTMORTEM Y DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS RELACIONADAS CON EL SISTEMA NERVIOSO AL BIOBANCO VASCO PARA LA INVESTIGACIÓN'.

SOLICITA QUE (por favor márquese una opción)

- Las muestras y datos ESTÉN CODIFICADOS, lo que permitiría la posibilidad de que familiares del fallecido pudieran beneficiarse de futuros resultados genéticos. Si así fuera:
 - Deseo recibir información de los resultados genéticos si los hubiera
 - No deseo recibir información de los resultados genéticos si los hubiera
- Las muestras y datos ESTÉN ANONIMIZADOS lo que implicaría la IMPOSIBILIDAD de que familiares del fallecido pudieran beneficiarse de futuros resultados genéticos

documentos de instrucciones previas, para verificar que no hubiera habido prohibición expresa.

Fecha Firma

Biobanco Vasco O-Ehun
Banco de Tejidos Neurológicos, Nodo del Hospital Txagorritxu. Servicio de Anatomía Patológica. c/Jose Arresegt s/n. 01009 Vitoria

3

Ley de Investigación
Biomédica, 2007

2. DISEÑO DEL PROCESO

Gestión de muestras y diagnóstico

Condiciones legales, documentación requerida:

Consentimiento informado

Consentimiento de autopsia

Certificado de defunción o autorización judicial

Condiciones científicas

Material no infeccioso

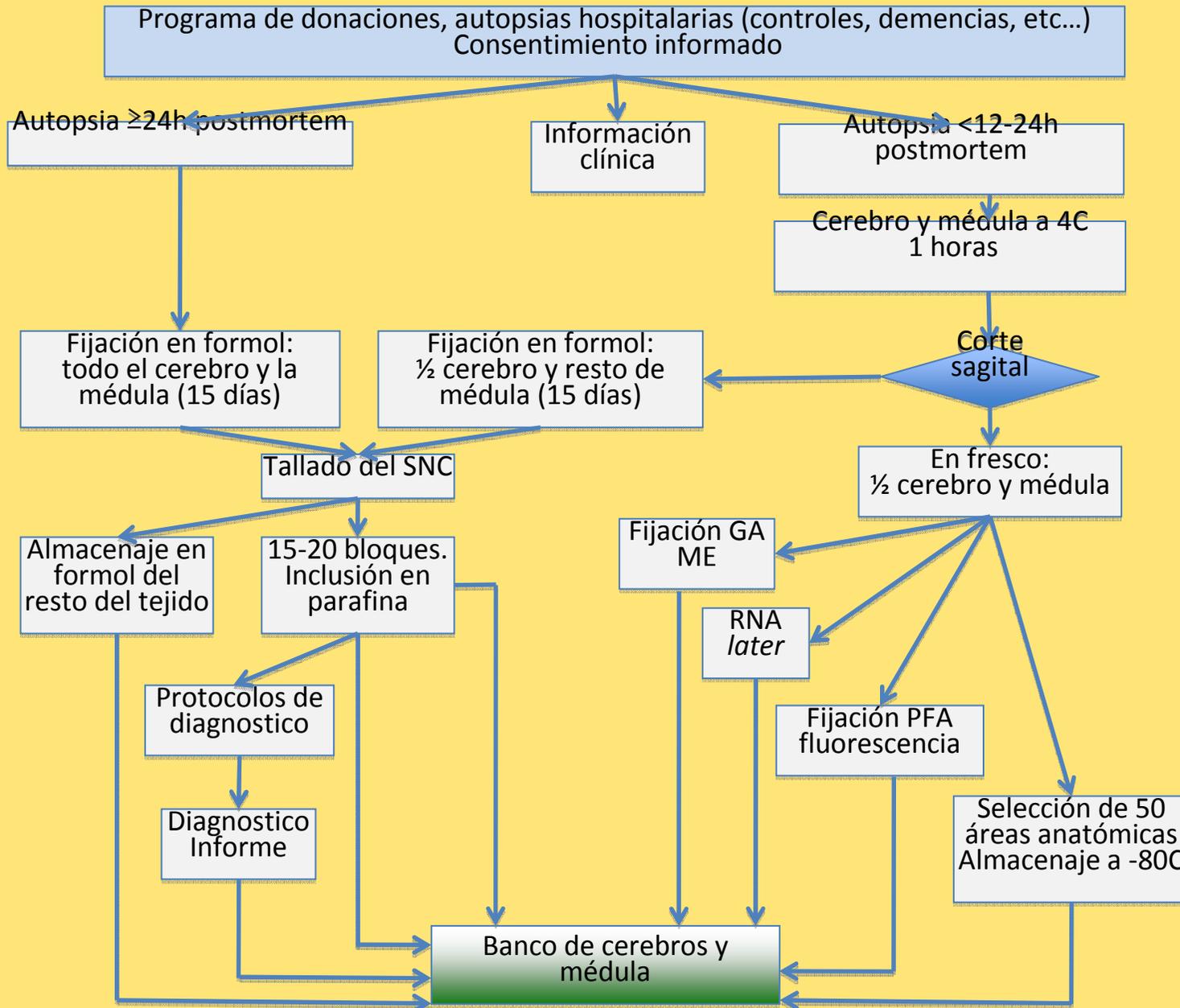
Tiempo postmortem, cambia criterios de procesamiento del material

NO UNICAMENTE el material congelado es tejido objeto de investigación

- Histoquímica e inmunohistoquímica
- ME
- molecular y genética

2. DISEÑO DEL PROCESO

Manejo de las muestras



2. DISEÑO DEL PROCESO

Manejo de las muestras

Día 0

Comprobación de la documentación

Obtención de datos clínicos

- ✓ Síntomas y EF
- ✓ Estado agónico (ingreso en UCI, gasometría y pH arterial, etc)
- ✓ Pruebas complementarias
- ✓ Estudio genético

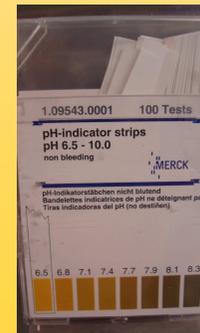
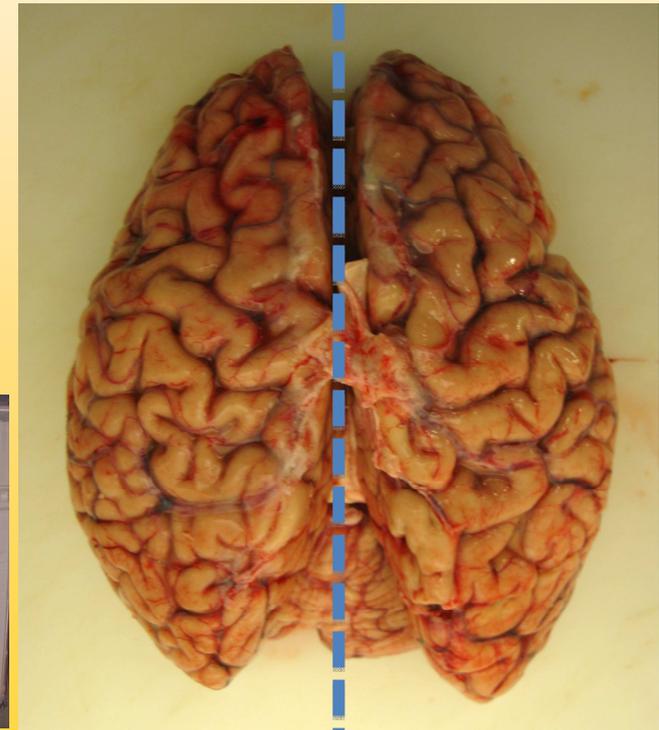
Determinación del tiempo postmortem

Peso del cerebro en fresco

Extracción de LCR y centrifugación

- ✓ Medición del pH
- ✓ Congelación del sobrenadante y pelet

Corte sagital



2. DISEÑO DEL PROCESO

Manejo de las muestras

Día 0

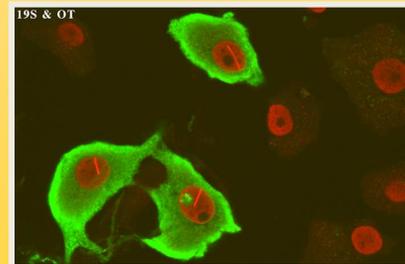
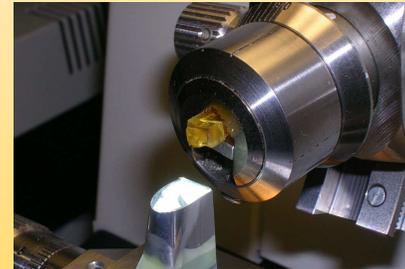
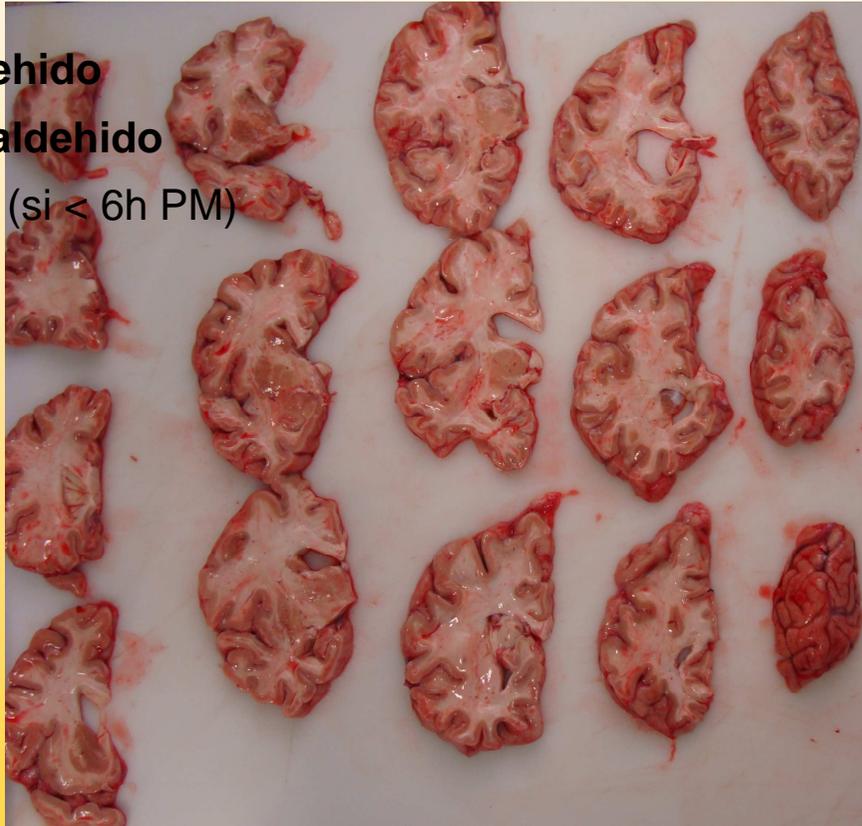
(microscopia electronica, fluorescencia, extraccion de RNA)

- Cortes de un hemiencéfalo, cerebelo y tronco del encéfalo
- Fotografiar
- Fijación de tejido de 5X5 mm de hipocampo, amígdala, tálamo, corteza, cerebelo en:

Glutaraldehido

Paraformaldehido

RNA *later* (si < 6h PM)

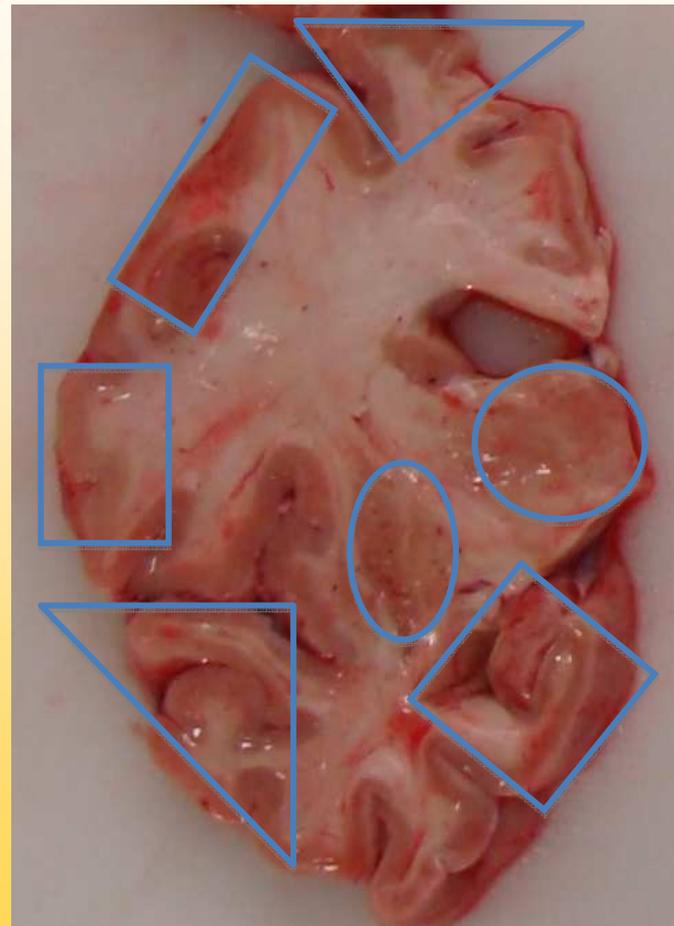
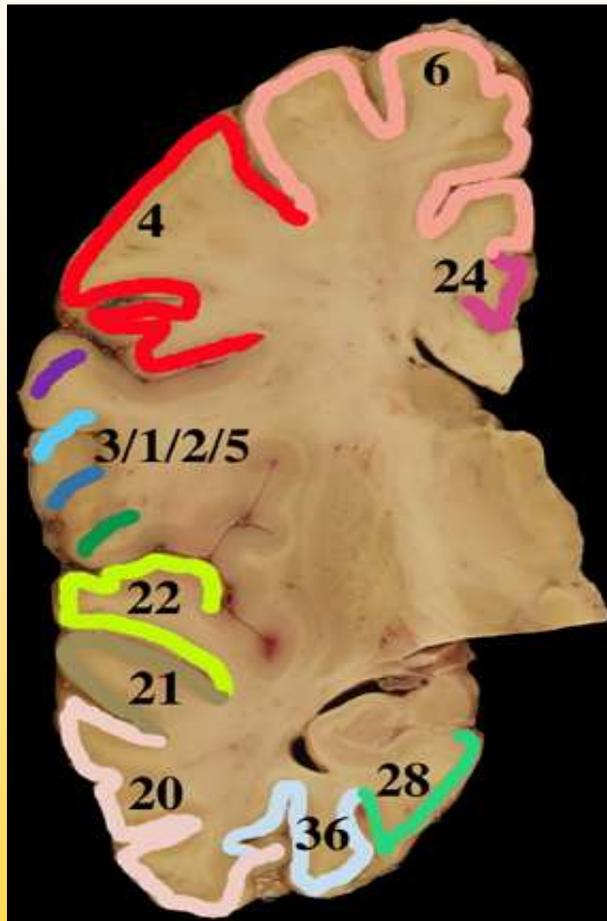
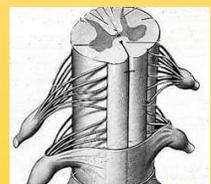
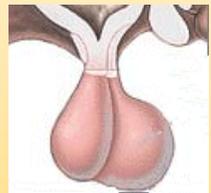


2. DISEÑO DEL PROCESO

Manejo de las muestras

Día 0

(tejido fresco congelado)



1. Bulbo olfatorio
2. Meninges
3. ½ hipófisis
4. Ganglio sensitivo dorsal

5. Lóbulo frontal, Somatosensorial
6. Corteza Motora
7. Área sensitiva primaria
8. Circunvolución superior y media

9. Hipocampo y C parahipocampal
10. Estriado
11. Tálamo
12. Cerebelo

13. Mesencefalo
14. Protuberancia
15. Bulbo

16.....
56

2. DISEÑO DEL PROCESO

Manejo de las muestras

Día 0

(tejido fresco congelado)

- Cada muestra se coloca en una bolsa de cierre hermético etiquetada
- Congelación rápida en placa de acero anionizado sobre nieve carbónica
- Almacenaje a – 80C



2. DISEÑO DEL PROCESO

Manejo de las muestras

Día 15

(fijación en formol e inclusion en parafina)

- Fijación en formol 4% durante 15 días
- Peso del hemiserebro y ½ troncoencefalico y cerebelo (entre 10-15%)
- Fotografiar
- Separación del TE y cerebelo mediante corte mesencefalico

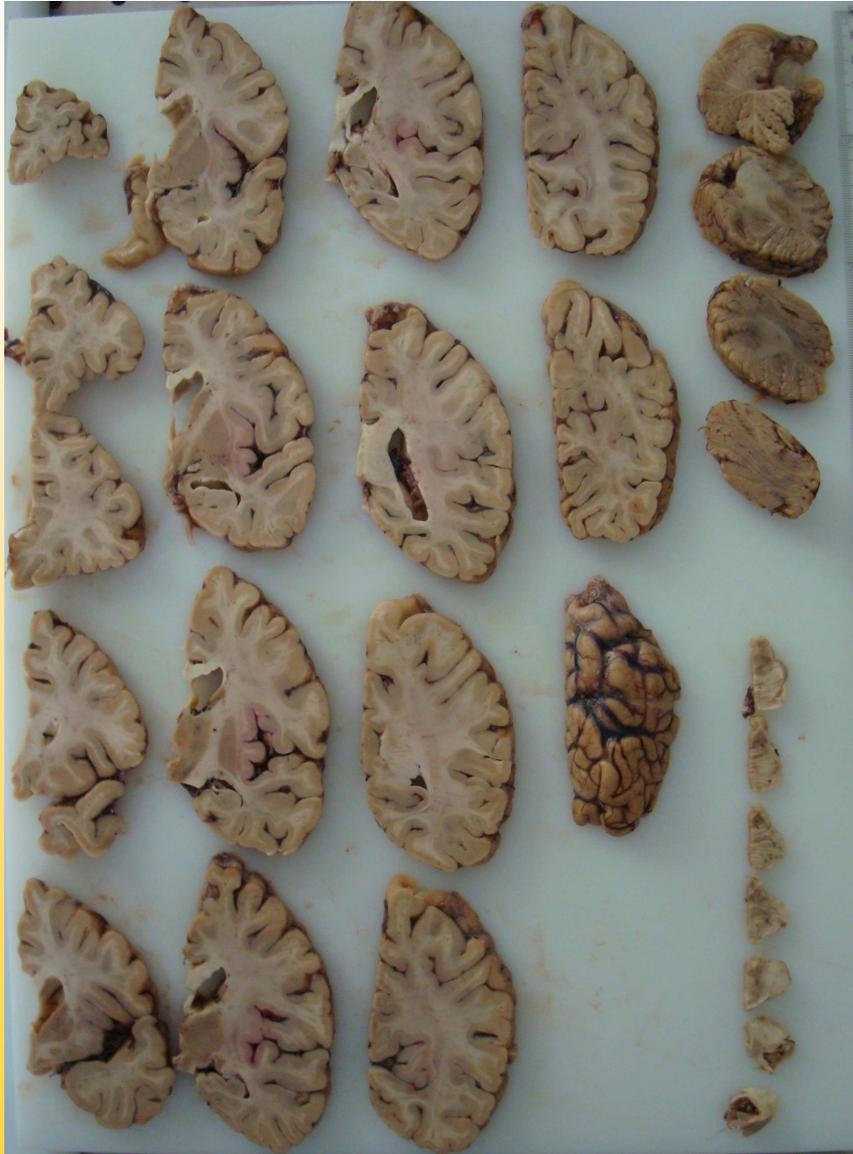


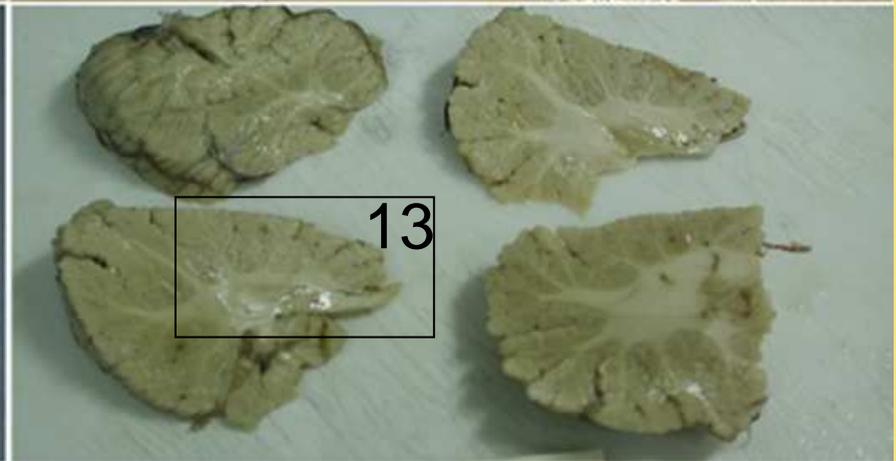
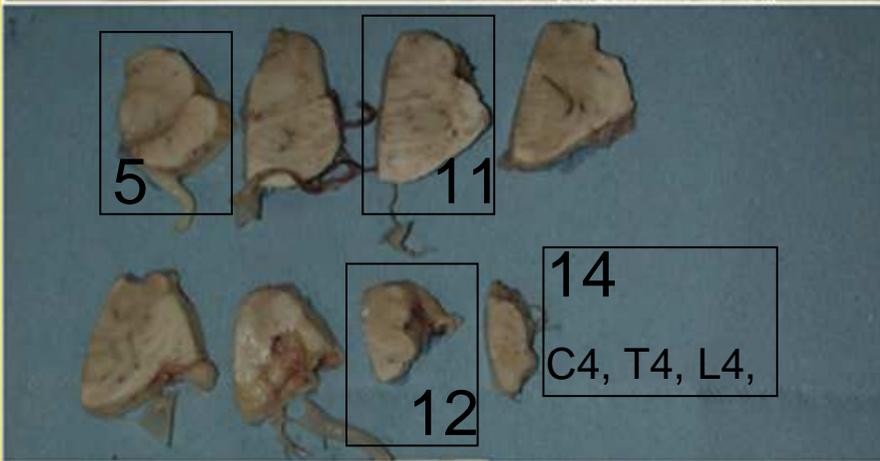
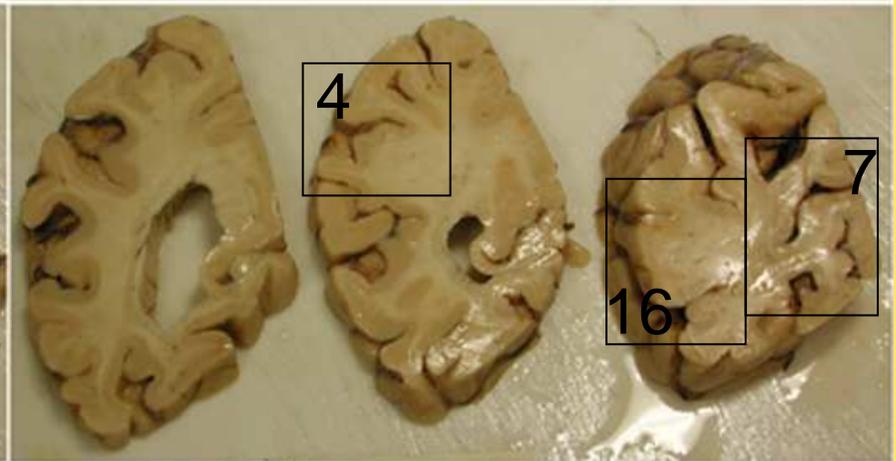
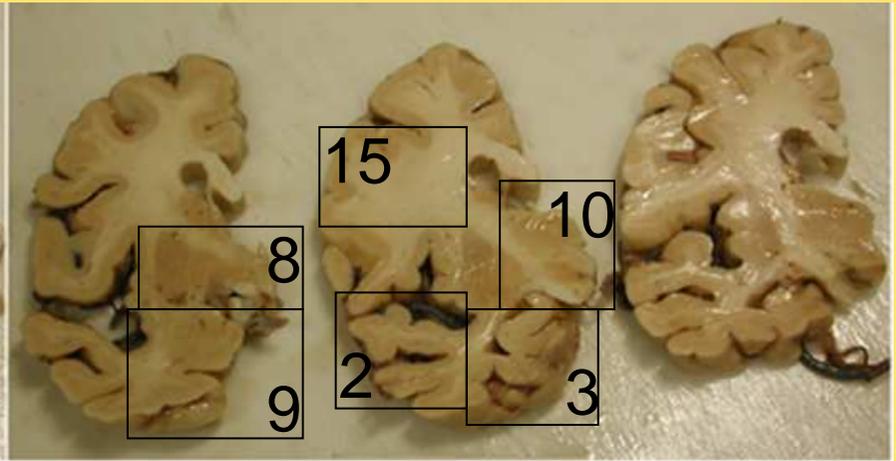
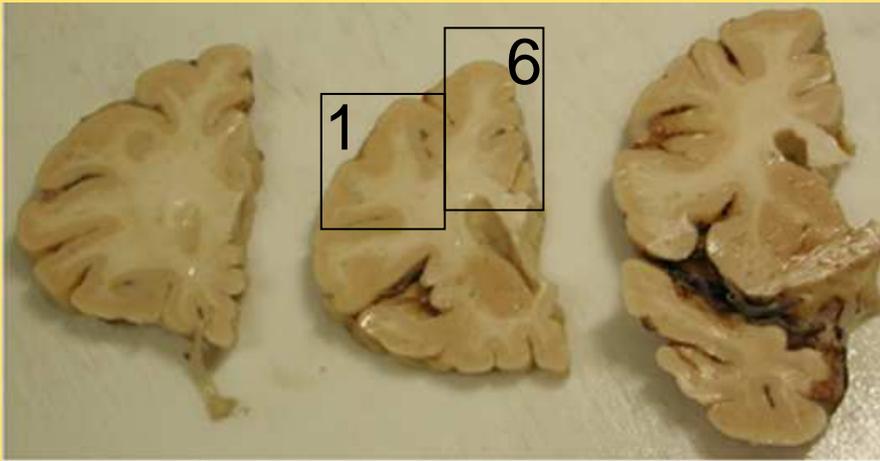
2. DISEÑO DEL PROCESO

Manejo de las muestras

Día 15

(fijacion en formol e inclusion en parafina)





2. DISEÑO DEL PROCESO

Manejo de las muestras

Día 15

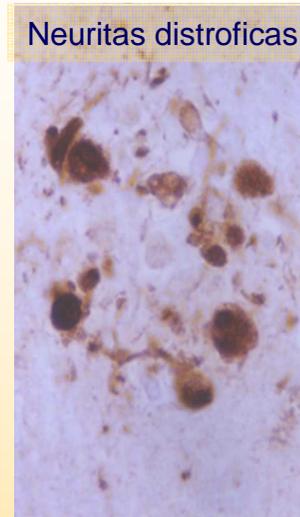
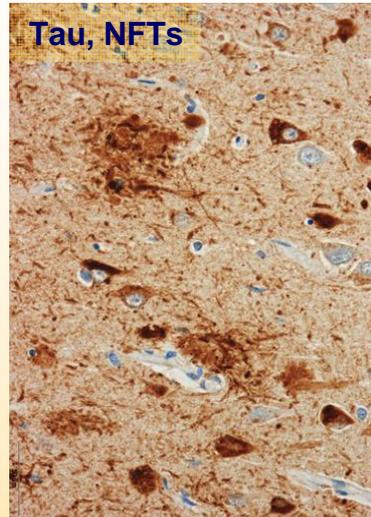
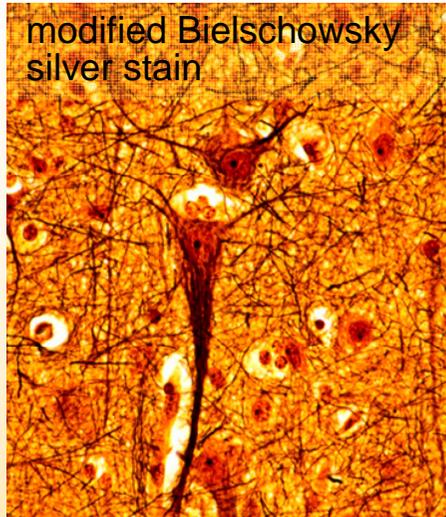
(fijación en formol e inclusion en parafina)

AP1	Circunvolución frontal media	AP16	Circunvolución precentral- superior
AP2	Circunvolución temporal media y sup	AP17	Circunvolución precentral - media
AP3	Hipoc anterior + circunv. parahipoc	AP18	Circunvolución precentral - lateral
AP4	Surco superior del lóbulo parietal	AP19	Medula espinal – cervical (2 niveles)
AP5	Mesencefalo	AP20	Medula espinal – torácica (2 niveles)
AP6	Circunvolución frontal superior	AP21	Medula espinal – lumbar (2 niveles)
AP7	Surco calcarino	AP22	Hipotalamo y Nucleo basal de Meynert
AP8	Estriado	AP23	Insula
AP9	Amígdala	AP24	Ganglio sensitivo dorsal
AP10	Tálamo	AP25	Hipocampo posterior y C parahipoc
AP11	Protuberancia	AP26	
AP12	Bulbo	AP27	
AP13	Cerebelo (núcleo dentado)	AP28	
AP14	SB lóbulo frontal	AP29	
AP15	SB lóbulo occipital	AP30	

Histoquímica, Inmunohistoquímica, DNA

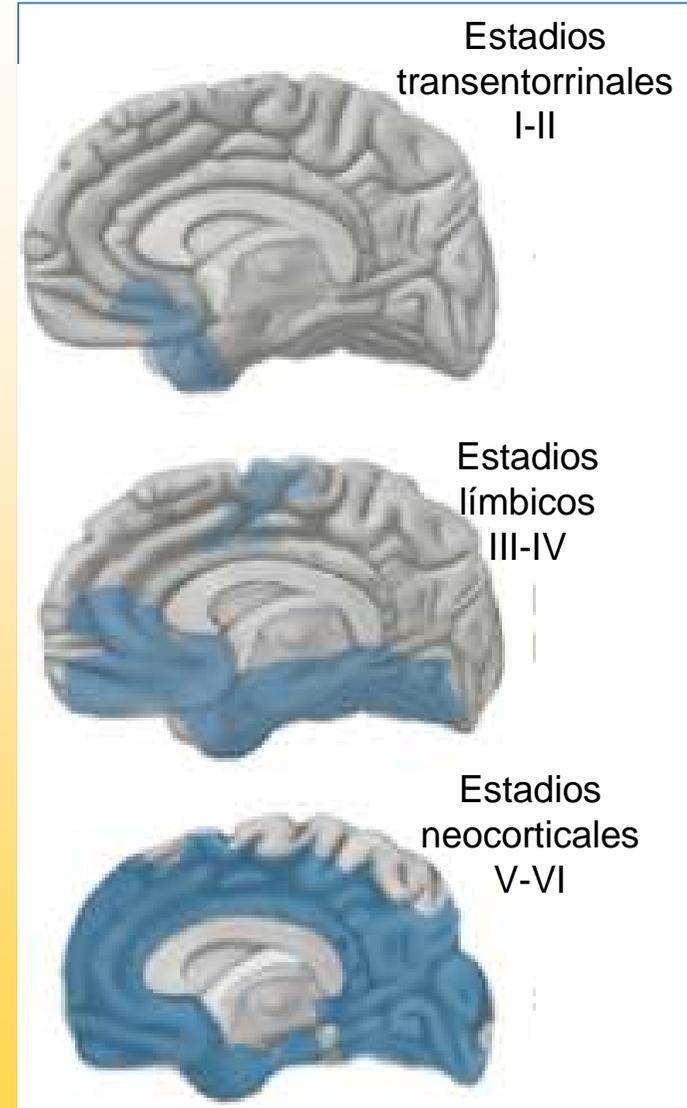


2. DISEÑO DEL PROCESO *Diagnostico*



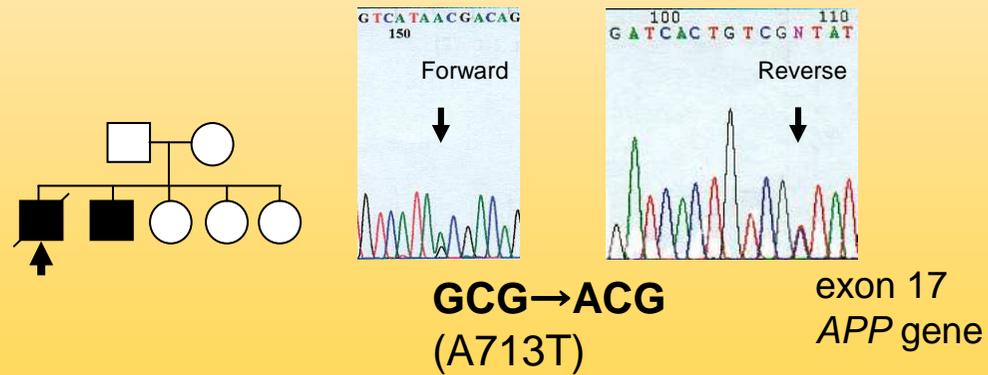
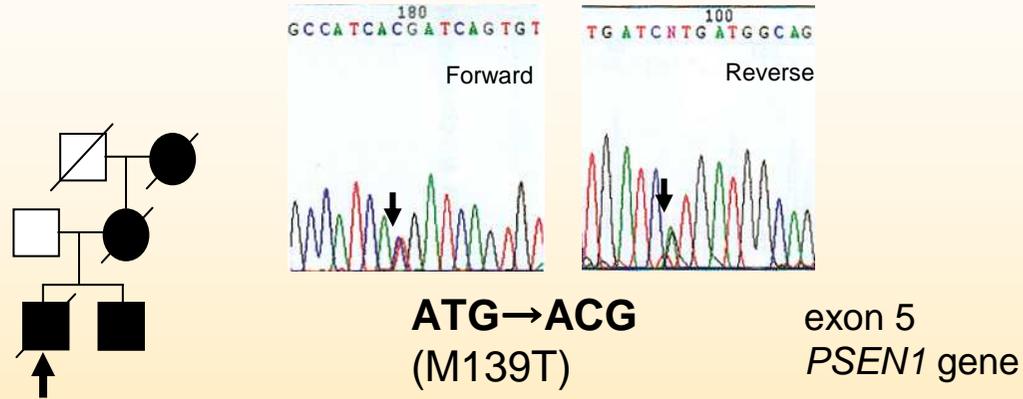
Tau 3R/4R A4 β Ubiquitina/p62	TDP43 A-B cristalina Neurofilamentos FUS protein
--	---

- Diagnostico
- Estadiaje
- Estudio de la agregación de otras proteínas y asociación de otras patologías



2. DISEÑO DEL PROCESO

Estudio genetico



Isidro Ferrer

UTILIDAD DE LOS BANCOS DE CEREBROS

Genética de la enfermedad de Alzheimer

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER ESPORADICA

Etiología multifactorial

FACTORES GENÉTICOS EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

- Mutaciones que explican los casos de enfermedad de Alzheimer familiar de comienzo temprano (*1-5 % de casos*)

Gen de la **Proteína Precursora de Amiloide** (herencia mendeliana, cromosoma 21)

Gen de la **Presenilina 1** (cromosoma 14)

Gen de la **Presenilina 2** (cromosoma 1)

- Polimorfismos que pueden incrementar la susceptibilidad de padecer enfermedad de Alzheimer esporádica (*90-95% de todos los casos*):

Confirmados: **Alelo ϵ 4 del gen de la Apolipoproteína E (APOE)**, (cromosoma 19).

No confirmados universalmente

Gen de la α -2 macroglobulina

Gen del receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)

Gen de la α -1 antitripsina. Gen de butirilcolinesterasa K

Gen de ubiquitina

Gen de la proteína τ .

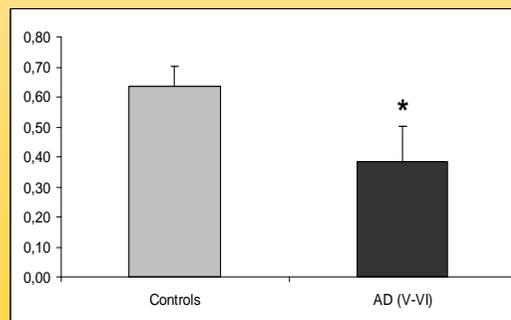
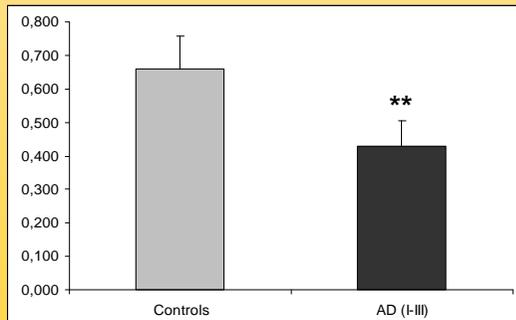
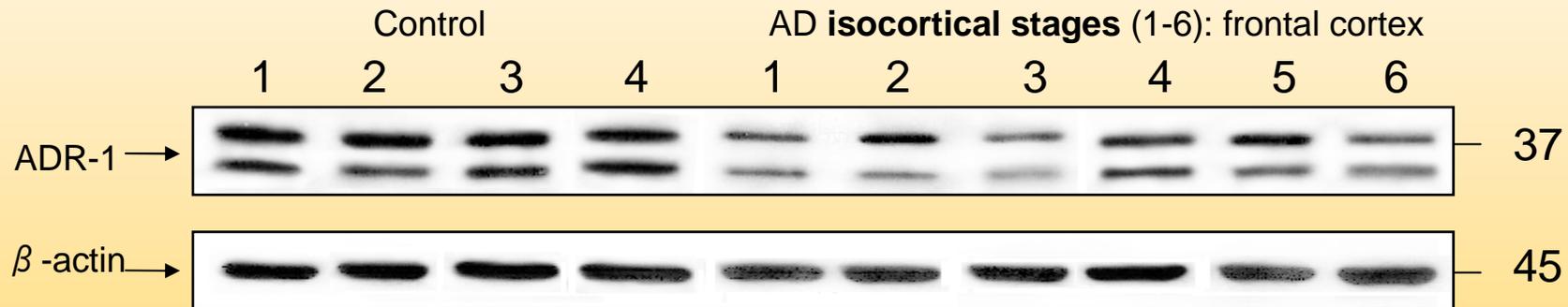
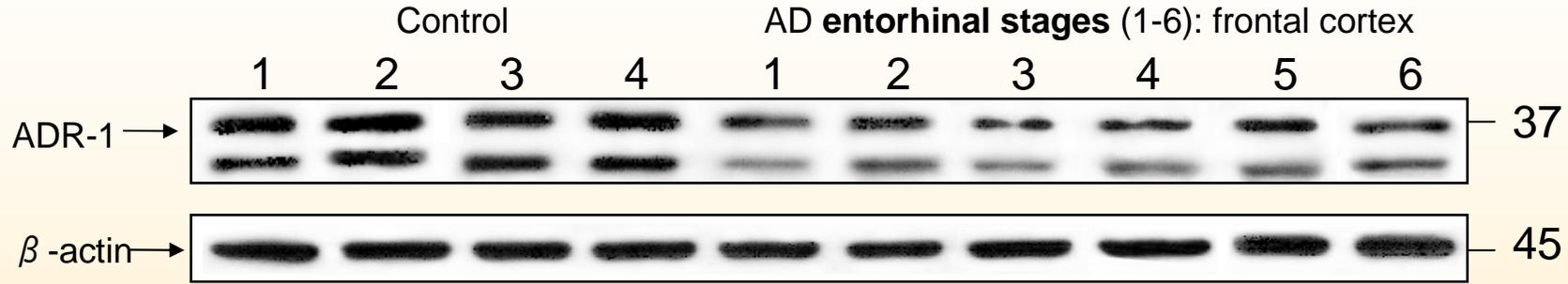
Genes mitocondriales (citocromo-oxidasas I y II)

Genes de las interleucinas 1A y 1B.

.....hasta 70 genes.

UTILIDAD DE LOS BANCOS DE CEREBROS

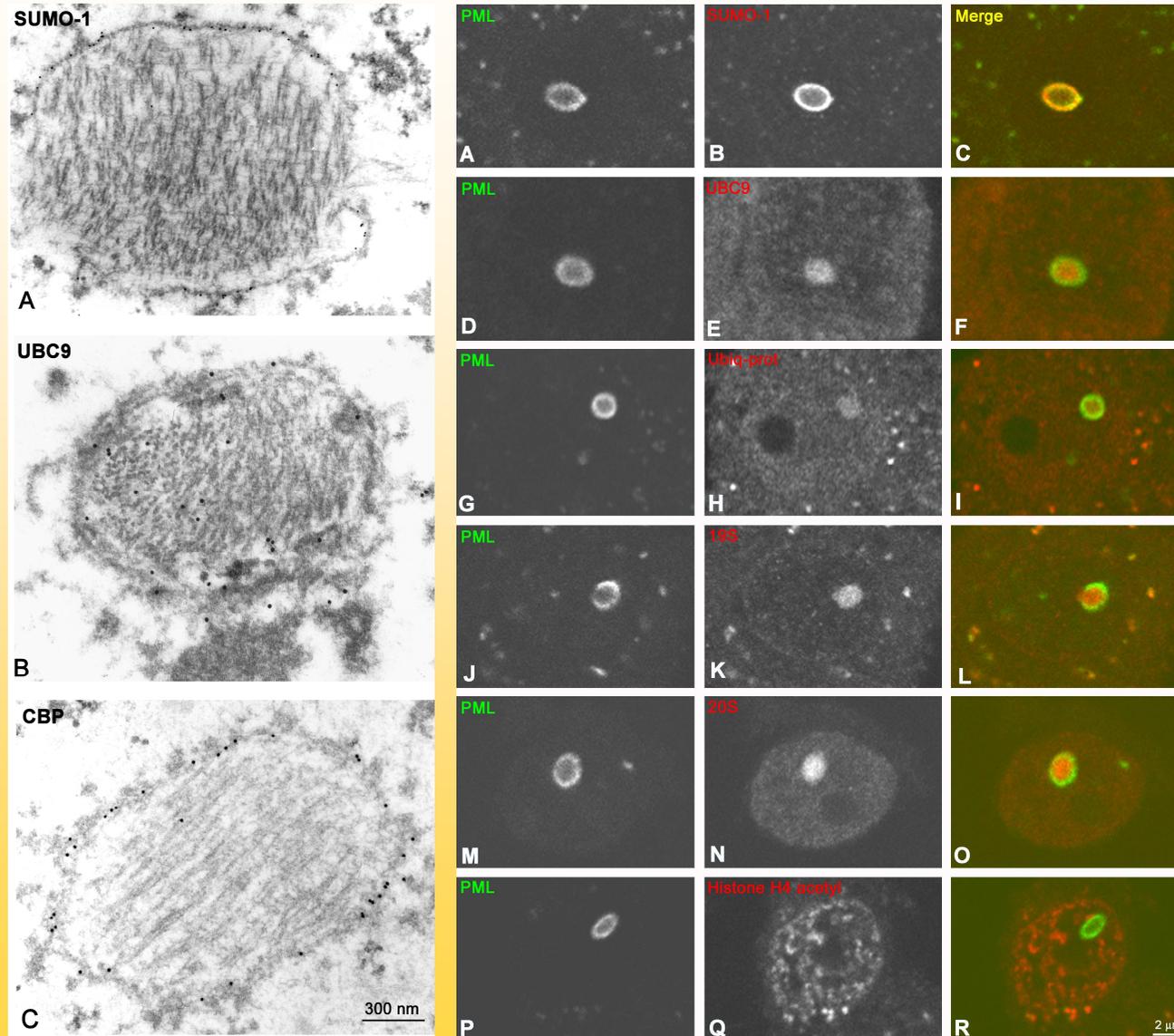
Cambios iniciales en la enfermedad de Alzheimer



La expresion de ADR-1 esta reducida en la corteza frontal en estadios muy tempranos o subclinicos de la enf. de Alzheimer

UTILIDAD DE LOS BANCOS DE CEREBROS

Nuevo compartimento nuclear en las neuronas del nucleo supraoptico humano



2. DISEÑO DEL PROCESO

Objetivos

1. Aportar tejido bien preservado a investigadores del ámbito de las neurociencias
2. Mantener unos objetivos de excelencia en el proceso de almacenamiento de tejidos incluidos en parafina, araldita, fijación en paraformaldehido y congelado.
Obtención de la ISO9001
3. Mantener una política de transparencia respondiendo a los solicitantes investigadores

3. PLATAFORMA INFORMÁTICA

MODULO DE DATOS DEL DONANTE

Asignación de un código del donante

NX: BNT y nodo Txagorritxu

01: acrónimo del depositario

10: año de alta del donante en el biobanco

001: numero del caso

Filiación

Datos relativos al fallecimiento

Antecedentes

Clínica

Pruebas complementarias

MODULO DE DATOS DE MUESTRAS

Fecha de entrada, procesamiento, tiempo postmortem, etc...

Facultativo, lugar de procedencia

Código de tejido (cerebro, LCR, músculo, nervio, sangre, etc...)

MODULO DE PROCESAMIENTOS

Protocolos (congelación, fijación en formol, GA, PFA, RNAlater, etc)

CESIONES Y CONTROL DE CALIDAD

4. CONTROL DE CALIDAD

Identificación de indicadores de proceso

- ✓ Diseño de *checklist*
 - Control de praxis del personal
 - Control de bioseguridad
 - Control de recepción de muestras e información clínica
 - Corrección de errores
 - Reajuste del proceso establecido
- ✓ Proceso de obtención de la acreditación de la ISO9001

Indicadores de resultado

- ✓ Medición del pH en LCR
- ✓ Calidad (cuantificación y ratios) de ADN y ARN mediante electroforesis
- ✓ Cortes histológicos, ultraestructurales, inmunofluorescencia, hibridación in situ

OTROS OBJETIVOS DEL BIOBANCO DE TEJIDOS NEUROLOGICOS

1. Desarrollar una labor de diseminación y promoción del conocimiento sobre bancos de cerebros a través de reuniones y otras publicaciones científicas
2. Formación
3. Facilitar la colaboración entre científicos de ciencias básicas, patólogos y clínicos
4. Participar en el diseño y mejora de los protocolos de donaciones y utilización de tejidos a través del consentimiento informado
5. Desarrollo de proyectos de innovación. Explotación
6. Establecer redes de colaboración con otros bancos de tejidos

VENTAJAS DEL BIOBANCO DE TN

- **El incremento de muestras e información clínica asociada incrementa exponencialmente su valor**
- **Desarrollo biotecnológico y bioinformático**
- **Establecimiento de nuevas estrategias investigadoras**
- **Protocolos diagnósticos estandarizados**

PRINCIPALES PROBLEMAS

- Dificultad para obtener el consentimiento informado
- Incremento de costos
- Personal especializado en *brain banking*
- Disponer de una historia clínica completa

Otros tejidos

- Banco de cerebros
- Bancos de tejido muscular
- Bancos de tumores del sistema nervioso central y periférico
- Bancos de sangre y suero
- Bancos de liquido cefalorraquídeo
- Bancos de ADN
- Bancos de fibroblastos, líneas celulares inmortalizadas procedentes de pacientes

NODO TXAGORRITXU

Roberto Bilbao
Isabel Guerra

Guiomar Perez de Nanclares
Amparo Viguri
Nuria Terán Villagrà

Edurne Arrieta
Ikerne Vicente
Jennifer Mediavilla

