

INVESTIGACIÓN Y PATOLOGÍA MOLECULAR

Esquema

INVESTIGACIÓN Y PATOLOGÍA MOLECULAR

- Introducción (Enrique de Álava)
- Investigación (Enrique de Álava)
- Patología Molecular Diagnóstica y Dianas Terapéuticas (Fernando López-Ríos, Santiago Montes)
- Biobancos (Manuel Morente)
- Consentimiento Informado en Investigación (Victoria Cusí)
- Oportunidades y limitaciones de las muestras de bancos de tejidos neurológicos para estudios moleculares (Isidro Ferrer)

Investigación

1. El **papel** de la investigación en el hospital
2. Qué cosas han cambiado **desde 2009**
3. **Datos**: Resultados de la encuesta
4. **Retos**. Nichos donde el patólogo puede ser útil
5. **Cuellos** de botella y sus remedios

1. El papel de la investigación en el hospital

- *La calidad de la asistencia mejora cuando hay investigación de calidad.*
- La investigación ‘**traslacional**’
- La “olvidada” investigación **clínica**

2. ¿Qué cosas han cambiado desde 2009?

- Reducción de **financiación**
 - Desplome de la financiación pública
 - Descenso de la financiación privada
- **Institutos** de investigación sanitaria
 - Centrados en el hospital y su actividad
 - Multidisciplinares y multiprofesionales

3. Datos: Resultados de la encuesta

- **Percepción** de la importancia de la investigación.
- **Liderazgo** investigador de los patólogos.
- Cantidad y **calidad** de producción científica.
- Innovación y **transferencia**.

4. Retos: Nichos donde el patólogo puede ser útil

- **Temáticos**
 - Validación de biomarcadores.
 - Desarrollos diagnósticos.
 - Apoyo tecnológico.
- **Organizativos**
 - Liderazgo de equipos de investigación
 - Biotecnología: canalizar la innovación.
 - Gestión de la calidad de la investigación

5. Cuellos de botella y sus remedios

- **Tiempo** protegido para la investigación
- **Incorporación** de personal investigador
- Peso de la investigación en **baremos** de contratación
- **Captación** de recursos de investigación
- **Formación** de grado y posgrado
- **Formación** de personal técnico

Esquema

INVESTIGACIÓN Y PATOLOGÍA MOLECULAR

- Introducción (Enrique de Álava)
- Investigación (Enrique de Álava)
- Patología Molecular Diagnóstica y Dianas Terapéuticas (Fernando López-Ríos, Santiago Montes)
- Biobancos (Manuel Morente)
- Consentimiento Informado en Investigación (Victoria Cusí)
- Oportunidades y limitaciones de las muestras de bancos de tejidos neurológicos para estudios moleculares (Isidro Ferrer)

Patología Molecular Diagnóstica y Dianas Terapéuticas

1. Consideraciones generales
2. Diagnóstico molecular. Catálogo de pruebas
3. Evolución y nivel de implantación de las técnicas de patología molecular en España
4. Envío de muestras a centros de referencia
5. Conclusiones y direcciones futuras

1. Consideraciones generales

- *Nuevos marcadores con valor diagnóstico, pronóstico y predictivo de respuesta a terapias dirigidas.*
- *Es tarea del patólogo conocer y participar activamente en este avance así como incorporar gradualmente en su práctica diaria aquellos marcadores que sean validados en el ámbito clínico.*
- condiciones óptimas de **calidad técnica e interpretativa**
- **Equipo multidisciplinar** que incluya biólogos moleculares, técnicos de laboratorio, patólogos y hematólogos-oncólogos.
- El catálogo de técnicas moleculares se basa en la **clasificación de las neoplasias (WHO)** y en **guías de práctica clínica de consenso** elaboradas por comités de expertos patólogos y hematólogos-oncólogos como la NCCN y la BSCH.
- **OBJETIVO:** Desarrollo de este tipo de guías de consenso a nivel nacional, con el fin de **normalizar los criterios diagnósticos y métodos empleados en el mismo, especialmente en patología oncohematológica.**

2. Diagnóstico molecular. Catálogo de pruebas

Tumores sólidos

- **Determinaciones imprescindibles:** mutaciones de **EGFR**, **KRAS**, **BRAF** y **KIT**, además de la amplificación de **HER2** y la traslocación de **ALK**. Es muy deseable también el estudio de mutaciones de **PI3CA**, de la metilación de **MGMT** o la delección de **1p19q**, por ejemplo.

Patología no neoplásica

- Patología infecciosa (la misma prueba se puede hacer a veces por distintas técnicas, inmunohistoquímica, hibridación *in situ* o PCR).
- Importancia estratégica de la determinación de **HPV**.

Hematopatología

• INMUNOHISTOQUÍMICA:

- **CITOGENÉTICA:** El uso de técnicas de citogenética para la detección de reordenamientos específicos es crucial en el diagnóstico de algunas patologías hematolinfoides (i.e Linfoma de Burkitt, t (8;14), recomendación grado C, nivel de evidencia III*).

- Determinaciones imprescindibles: **C-MYC**, **BCL2**, **BCL6**, **MALT1**, **CCDN1**, **ALK**, **del17p (p53)**.

• ANÁLISIS DE CLONALIDAD LINFOIDE:

*National Institute for Clinical Excellence and the British Committee for standards in Hematology + NCCL guidelines.

3. Evolución y nivel de implantación de las técnicas de patología molecular en España

¿Tiene implementadas técnicas de Patología Molecular?

		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	No	41	47,7
	Si	45	52,3
	Total	86	100,0

- Incremento en implementación de técnicas de Patología Molecular entre los años 2005-2010, muy centradas en *EGFR*, *KRAS* y *BRAF*. Inestabilidad de microsatélites y las mutaciones en *KIT* y *PDGFR*. En patología no neoplásica, destaca el estudio de agentes infecciosos (sobre todo HPV y micobacterias).

- METODOLOGÍA: PCR cuantitativa en ascenso (p ej para estudio intraoperatorio de ganglio centinela en cáncer de mama).

En el caso del estudio del HPV, la PCR parece el método más frecuentemente utilizado.

- CISH/SISH vs FISH. Técnicas de campo claro, mayor aceptación entre patólogos (p ej HER2 (23 centros frente a 18)). FISH oligodendrogliomas y sarcomas (sobre todo sarcoma sinovial y sarcoma de Ewing).

En España la inclusión de una prueba molecular en la cartera de servicios parece realizarse en base a una necesidad clínica real.

Patología hematolinfoide

- **Menor implementación que las técnicas de diagnóstico molecular en tumores sólidos**, cuestión de volumen.
- El panel de sondas de FISH disponible en los centros es variable. Hibridación *in situ* cromogénica (CISH) para la detección de RNAs virales (EBV-EBER) y de cadenas ligeras kappa y lambda. Nivel de implantación bajo (4 y 3 centros respectivamente).
- **La demostración de EBV es condición para el diagnóstico de algunos procesos linfoproliferativos.**
- Hibridación *in situ* para cadenas ligeras kappa (κ) y lambda (λ), sensibilidad menor que una inmunohistoquímica óptima para κ y λ en procesos linfoproliferativos. No obstante es de utilidad como marcador de primera línea en proliferaciones de células plasmáticas si los resultados de IHQ no resultan totalmente específicos.
- Método complementario a la IHQ, especialmente en la evaluación de procesos mieloproliferativos en los que los paneles de CMF están, por lo general más desarrollados que los de inmunohistoquímica. Indicaciones específicas: método auxiliar en la evaluación de muestras de PAAF de ganglio linfático.

4. Envío de muestras a centros de referencia

¿Se envían casos a un centro de referencia?			
		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	Sin respuesta	9	10,5
	No	15	17,4
	Si	62	72,1
	Total	86	100,0

El número de centros que envían muestras a centros de referencia se ha ido incrementando gradualmente desde 1989 y especialmente desde 2005, alcanzando una meseta en los últimos 3 años.

OBJETIVO: ¿CENTROS DE REFERENCIA?

- Desarrollo técnico complejo (i.e electroforesis capilar para análisis de clonalidad o secuenciación directa, RT-PCR, microscopio de fluorescencia para el análisis de FISH).
- Volumen suficiente para asegurar viabilidad y calidad.
- Centros que tengan la infraestructura, el personal cualificado y la certificación de calidad adecuada en cada caso y programas de control de calidad externos.
- Necesidad de un sistema estructurado de derivación de estudios a estos centros.

5. Conclusiones y direcciones futuras

- **Los resultados se deben integrar en un único informe final anatomopatológico.**
- Guías de práctica clínica a nivel nacional por parte de un comité de patólogos y hematólogos-oncólogos.
- Como demuestra la encuesta, este área está experimentando un desarrollo sin precedentes en los Departamentos de Anatomía Patológica debido sobre todo a la necesidad de estudiar **biomarcadores predictivos de respuesta a fármacos dirigidos.**

RETOS Y COMPLEJIDADES ESTRATÉGICAS:

- **Masa crítica de patólogos con probada formación y experiencia en patología molecular.** Un avance importante sería la inclusión reglada de estas habilidades en el programa MIR y la creación de un *directorio de laboratorios que ofrezcan formación en este campo.*
- **Acreditación de los laboratorios** que pretenden dar servicio de diagnóstico molecular..
- **Norma ISO15189.**
- **Regulación de redes de centros de referencia,** de diagnóstico molecular.

5. Conclusiones y direcciones futuras

- **Determinación de HPV.** Teniendo en cuenta la desafortunada relevancia que está adquiriendo la determinación de HPV en detrimento de la citología vaginal, sería muy deseable que esta prueba estuviera siempre implementada.
- **Cáncer hereditario/familiar.** Al tener ya disponibles en nuestra cartera de servicios el estudio de la inestabilidad de microsatélites o la mutación de *BRAF*, habría que incorporar lo antes posible el estudio de las mutaciones de *BRCA1/2* (que además podrían ser predictivas de respuesta a fármacos anti-PARP).
- **Secuenciación de próxima generación.** Debido a la inexcusable necesidad de control morfológico y a que sus resultados deben de complementarse con inmunohistoquímica, FISH o PCR, habría que incorporar al menos la “targeted deep sequencing” en la cartera de servicios de algunos Departamentos de Anatomía Patológica.
- **Integración de los patólogos en equipos multidisciplinares (grupos cooperativos, comités de tumores, etc...).** Esto está suponiendo un acercamiento a los pacientes, que piden más información de sus complicados informes “moleculares”. Habría que canalizar esta vertiente clínica para potenciar nuestra visibilidad hospitalaria y social.
- **Papel central en el manejo adecuado de los pacientes.**

Esquema

INVESTIGACIÓN Y PATOLOGÍA MOLECULAR

- Introducción (Enrique de Álava)
- Investigación (Enrique de Álava)
- Patología Molecular Diagnóstica y Dianas Terapéuticas (Fernando López-Ríos, Santiago Montes)
- Biobancos (Manuel Morente)
- Consentimiento Informado en Investigación (Victoria Cusí)
- Oportunidades y limitaciones de las muestras de bancos de tejidos neurológicos para estudios moleculares (Isidro Ferrer)

BIOBANCOS: 1. Pieza clave en investigación

- Las técnicas de análisis masivo precisan de tejido enfermo como de tejido normal de referencia, procedente de la práctica clínica y con mínima degradación de RNA y proteínas, es decir, correctamente congelados y conservados.
- Los **biobancos** constituyen, más que una actividad, una disciplina científico-técnica caracterizada por su juventud y su complejidad.
- Su **complejidad** viene macada por la variedad del **servicio** al que está vocacionada y por los múltiples aspectos que abarca entre los que se incluyen:
 - Aspectos sociales
 - Aspectos éticos
 - Aspectos legales
 - Aspectos técnicos
 - Aspectos científicos, tanto propios como en clave de las necesidades de los usuarios
 - Aspectos de gestión

Biobancos: 2. Papel del patólogo

- El **papel del patólogo en investigación**, y en biobancos, incluye, al menos, los siguientes aspectos:
 - Su experiencia médica y científica es fundamental en:
 - La toma de decisiones diagnósticas, proporcionando anotaciones específicas y supervisando la adquisición de muestras, y
 - La revisión de las muestras, el suministro de información antes de procesarla y su distribución a los laboratorios de investigación.
 - El patólogo es un actor clave en la continuidad entre la atención médica y la investigación.
 - El patólogo aporta valor y experiencia a la definición de los tejidos incorporados al biobanco de forma que su contribución científica a la investigación con muestras resulta crítica.
 - El patólogo valida la idoneidad de la muestra de tejido y su uso para un fin concreto de investigación, con exclusión de posibles conflictos con el fin primario para el que normalmente es recogida la muestra, el diagnóstico.
 - El patólogo tiene una función clave como custodio de las muestras conservadas en los archivos diagnósticos de los servicios de Anatomía Patológica.

Virchows Arch (2010) 456:449–454.

Biopreservation & Biobanking (2010), 7 (3): 157-160.

Biobancos: 3. Ventajas para el Servicio de Patología

- La novedad y el interés estratégico de los biobancos ha estimulado un progresivo interés por establecer **indicadores adecuados de calidad** para todo el proceso del biobanco que han de repercutir directamente en la actividad de los servicios diagnósticos.
- La necesidad de optimizar las características de tejido ha de afectar incluso a los **procedimientos** más rutinarios en nuestros servicios de Patología: fijación óptima, evitación de excesivo tiempo de fijación, etc.
- La participación en un biobanco hospitalario facilita una ordenación del uso de muestras humanas y su información asociada acorde con el actual **desarrollo bioético y legislativo** y en especial con el reconocimiento de la autonomía del donante (paciente o sano) y su derecho a la confidencialidad de sus datos de carácter personal, tanto personales como familiares.
- Estímulo para la **optimización y reordenación** de procedimientos de captación y manejo de biopsias y piezas quirúrgicas (muestras y especímenes en fresco).

Biobancos: 4. El marco legislativo

- Principales leyes de referencia:
 - **Ley 14/2007** de Investigación biomédica y **RD1716/2011** sobre biobancos
 - **Ley Orgánica 15/1999**, de Protección de Datos de Carácter Personal y **Ley 41/2002**, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica.
- Se definen **tres únicos regímenes legales** de captación, procesamiento, cesión y uso de muestras biológicas humanas en investigación:

	PROYECTO	COLECCIÓN	BIOBANCO
Organización	No	Conjunto ordenado orientado a una línea de investigación	Si
Inscripción en el registro nacional de biobancos - ISCIII	No (1)(2)	Si (2)	Si
Necesidad de autorización por la comunidad autónoma	No	No	Si
Utilización	Proyecto concreto	Proyectos relacionados con una línea concreta	Proyectos de investigación biomédica
Conservación	En tanto que dure el proyecto	En tanto que dure la línea	En tanto persista el fin del biobanco
Alcance del CI	Consentimiento específico para un proyecto concreto	Consentimiento específico para una línea, un investigador y un centro	Consentimiento amplio (finalidad intrínseca)

(1) Pero deben ser comunicados al centro

(2) Si son muestras correspondientes a sujetos identificados o identificables deben inscribirse en la Agencia de Protección de datos

5. Archivos diagnósticos e investigación

- Es recomendable potenciar y hacer posible el uso de este material en investigación siempre que se cumplan los requerimientos legales, siendo el régimen de **biobanco** el más recomendable.
- **La cesión de muestras desde los archivos diagnósticos para su uso en investigación ha de estar enmarcado en lo dispuesto en la ley 14/2007 y el RD 1716/2011.**
- Ha de asegurarse en todo momento el fin primario: su correcto diagnóstico.
- Este fin primario no se acaba con la emisión del correspondiente informe anatomopatológico, sino que se mantiene en el tiempo.
- La cesión debe siempre estar mediada por la evaluación y aprobación de los correspondientes comités.
- **El responsable del servicio de Anatomía Patológica tiene, por ley, el privilegio y la responsabilidad de establecer el criterio de cesión o denegarla.**
- Se recomienda ir incluyendo en régimen de biobanco las muestras que sean solicitadas para investigación o que correspondan a líneas de investigación conocidas del propio centro u otras instituciones con las que se colabore de forma estable, con proyectos activos, así como casos poco incidentes o correspondientes a las conocidas como «enfermedades raras».
- Es muy recomendable extender el uso al mayor número posible de muestras quirúrgicas de un **Consentimiento Informado** adecuado para su uso secundario en investigación.
- **Los patólogos no somos ni propietarios ni usufructuarios de las muestras, sino custodios** de un material obtenido con un fin específico del que no podemos disponer a nuestro antojo ni siquiera para fines tan loables como es la investigación biomédica.



Esquema

INVESTIGACIÓN Y PATOLOGÍA MOLECULAR

- Introducción (Enrique de Álava)
- Investigación (Enrique de Álava)
- Patología Molecular Diagnóstica y Dianas Terapéuticas (Fernando López-Ríos, Santiago Montes)
- Biobancos (Manuel Morente)
- Consentimiento Informado en Investigación (Victoria Cusí)
- Oportunidades y limitaciones de las muestras de bancos de tejidos neurológicos para estudios moleculares (Isidro Ferrer)

Summary

1. Obtaining human brain samples for research

2. Registration, preparation and storage of brain tissue and related samples

2a. Anonymity and traceability of the samples

2b. Register (including minimal clinical data: Table I)

2c. Brain extraction and processing

2d. Processing for biochemical studies: frozen material (Table II)

2e. Morphological studies, formalin fixation (Table III)

2f. Neuropathological study (Table IV)

2g. Cryoprotection, and processing for electron microscopy

2h. Other biological samples

3. Possibilities, limitations and putative pitfalls inherent in the study of post-mortem human brain samples

4. Cession of samples for research

5. Management, and legal and ethical aspects

Relevant web pages

The UK Brain Banks Network:

<http://www.mrc.ac.uk/Ourresearch/Resourceservices/UKBrainBanksnetwork/index.htm>

National Institute of Neurological Disorders and Stroke: National Institutes of Health Regional Brain and Biospecimen Repositories:

<http://www.ninds.nih.gov/research/parkinsonsweb/brainbanks.htm>

Brain Net Europe. European Brain Bank Network :

www.brainnet-europe.org

includes a list of brain banks and repositories worldwide

Australian Brain Bank Network:

www.nnf.com.au/platforms/abbn

Table I: Minimal clinical data

•Personal data:

identification code of the centre (brain bank)
identification code of the patient
gender
age
date of death (day/month/year)
cause of death, agonic state
post-mortem delay

•Consent:

clinical autopsy
forensic autopsy
donor program
consent for genetic studies
limitations for further studies

•Familial, genetic and environmental factors:

family cases
genetics
Paediatric cases: gestation, delivery, perinatal infections, vaccinations
environmental factors: smoker, alcohol, drug abuse, work at risk
Treatments

•Antecedents of infectious or contagious disease:

•Risk factors: traumatism, obesity, arterial hypertension, diabetes, hyperlipidemia

•Main clinical symptoms and signs:

focal signs or lateralisation
mental impairment and dementia
psychiatric symptoms and signs (depression, anxiety, hallucinations, delusions, apathy, irritability, lack of inhibition, NPI: neuropsychiatric assessment in dementia)
motor signs: ataxia, parkinsonian symptoms and signs, chorea, myoclonus, amyotrophy, pyramidalism, ocular movements
sensitive symptoms and signs
autonomic signs
epilepsy
sleep disorders
others

•Course of the disease:

acute
sub-acute
chronic
relapsing/remitting

•Duration of the disease:

•Systemic disease:

•Relevant complementary examinations
biochemistry
neuroimaging
neurophysiology
others

•Cause of death:

•Clinical diagnoses:

Table III: Suggested paraffin blocks

Routine blocks

N1: medulla oblongata; N2a: mesencephalon (substantia nigra upper level); N2b: mesencephalon (substantia nigra lower level); N3: pons (locus ceruleus); N4: upper cerebellar vermis; N5: cerebellum and dentate nucleus; N6: right anterior hippocampus and parahippocampal gyrus; N7: left anterior hippocampus and parahippocampal gyrus; N8: caudate, putamen, accumbens; N9: frontal cortex area 8; N10: primary visual area and area 19; N11: amygdala; N12: basal nucleus of Meynert, globus pallidus; N13: hypothalamus, mammillary bodies; N14: anterior cingulate cortex; N15 right posterior hippocampus; N16: left posterior hippocampus; N17: parietal cortex at the level of the splenium; N18a: anterior superior and middle temporal gyri; N18b: posterior middle and inferior temporal gyri at the level of the geniculate nucleus; N19: posterior cingulate cortex; N20a: Medial and anterior thalamic nuclei, subthalamic nucleus; N20b: posterior thalamus; N21: hypophysis; N22: olfactory bulb and tract; N23: cervical spinal cord (N23a, b); N24: thoracic spinal cord (N24a, b); N25: lumbar spinal cord (N25a, b). N26: sacral spinal cord ; N27: Deep White matter of the frontal lobe; N28: spinal ganglia (N28a, b); N29: spinal nerve roots (N29a: anterior; N29p: posterior).

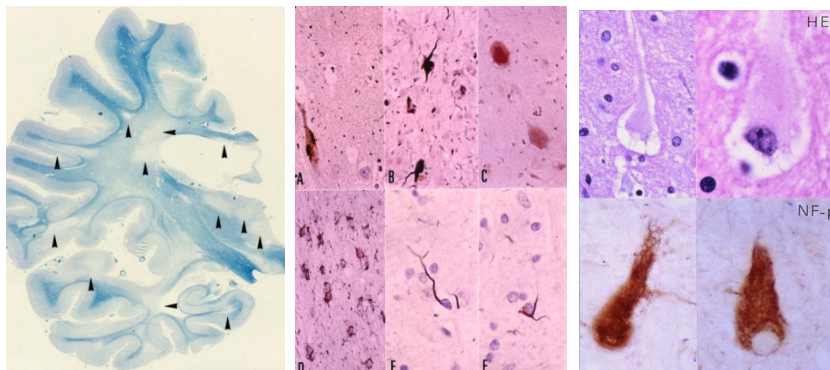
Reserve blocks

N30: orbitary cortex; N31: frontal cortex; N32: primary motor cortex (N32m) and primary somatosensorial cortex (N32s); N33: posterior temporal cortex; N34: angular gyri; N35: anterior insular cortex; N36: posterior insular cortex; N37: hippocampus (N37a, b); N38: caudate, putamen medial regions; N39: anterior thalamic nucleus (N39a); dorsomedial (N39b), pulvinar (N39p); N40: additional Meynert nucleus; N41: rest of the medulla oblongata (N41a, b, c); N42: rest of the pons (N42a, b, c); N43: rest of the mesencephalon (N43a, b, c); N44: rest of the spinal cord (N44a, b, c); N45: rest of the spinal ganglia (N45 a, b); N46: rest of the optic tracts and chiasm; N47: choroid plexus; N48: duramater; N49: identified cranial nerves.

Hemispheric blocks

A minimum of three blocks: frontal lobe, occipital lobe and cerebellum.

Additional blocks depending on the disease: mandatory additional samples in diseases with involvement of the white matter.



Distribution: MS
Staging: AGD
Lateralization: PPA

Table IV: Methods for current neuropathological diagnosis

Routine blocks

All the sections corresponding to routine blocks indicated in **Table II** are stained with hematoxylin and eosin and Klüver Barrera. Immunohistochemical staining should be conducted in selected regions and with selected antibodies. The most commonly employed antibodies are directed against glial fibrillary acidic protein (GFAP) for astrocytes, CD68 for microglia, AT8 for phosphorylated tau, tau3R and tau4R, β -amyloid for amyloid plaques and amyloid angiopathy, α -synuclein, ubiquitin, α B-crystallin, TDP-43 and phosphorylated neurofilament epitopes (i.e. RT97).

Suggested antibodies and regions in the study of adult brains are the following:

N1	α -synuclein, AT8
N2	α -synuclein, AT8
N3	α -synuclein, AT8
N4	RT97
N6	α -synuclein, β -amyloid, AT8, tau4R, tau3R, ubiquitin
N7	α -synuclein, β -amyloid, AT8, tau4R, tau3R, ubiquitin
N8	AT8
N9	AT8, ubiquitin, TDP-43, RT97, β -amyloid
N10	α -synuclein, β -amyloid, AT8
N11	α B-crystallin, α -synuclein, AT8
N15	β -amyloid, AT8, TDP-43
N16	β -amyloid, AT8, TDP-43
N17	β -amyloid
N22	AT8, α -synuclein
N23	RT97, TDP-43
N24	RT97, TDP-43
N25	RT97, TDP-43
N29	RT97

The application of GFAP and CD68 antibodies will be done depending on the preliminary findings.

Hemispheric blocks

Sections are stained with haematoxylin and eosin, and Klüver Barrera or other myelin stain.

Specific pathologies

The study of other regions and the application of additional antibodies will depend on the particular disease, as examples: anti-PrP (clones 3F4 and 1E4) in prion diseases, lymphocyte and cytokine markers in inflammatory diseases, anti-phosphorylated TDP-43 in certain frontotemporal lobar degenerations (FTLD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS), FUS in ubiquitin positive/TDP-43 negative FTLD and ALS, anti-polyglutamine expansions and specific antibodies (i.e. anti-huntingtin, anti-ataxin1, 2, 3) in trinucleotide repeat disorders.

Antibodies against Notch, extracellular matrix and collagen can be useful in certain vascular diseases.

Stains to lipids and carbohydrates, and stains to iron, calcium and other pigments can be useful in determinate conditions.

Silver stains as methenamine silver, and Bielchowski and Gallyas stains can be used, particularly the later, after training.

Table II: Suggested frozen sections

Obtaining frozen samples has to be carried out rapidly. The small pieces should be frozen on metal plaques over dry ice, kept on individual air-tight plastic bags and numbered with water-resistant ink or by using appropriate tags.

Dissected blocks

F1: medulla oblongata; F2a: substantia nigra; F2b: rest of the mesencephalon; F3: pons (locus ceruleus); F4: upper cerebellar vermis; F5: cerebellum and dentate nucleus; F6: olfactory bulb and tract; F7: right anterior hippocampus and parahippocampal cortex; F8: left anterior hippocampus and parahippocampal cortex; F9a: amygdala; F9b: amygdala and entorhinal cortex; F10c: caudate; F10p: putamen; F10c: accumbens; F11a: basal nucleus of Meynert; F11b: globus pallidus; F12: hypothalamus, mammillary bodies; F13: orbital cortex; F14: frontal cortex area 8; F15: anterior cingulate cortex; F16a: primary motor cortex; F16b: primary somatosensorial cortex; F17: anterior superior and middle temporal gyri; F18: right posterior hippocampus; F19: left posterior hippocampus; F20: parietal cortex at the level of the splenium; F21: posterior middle and inferior temporal gyri at the level of the geniculate nucleus; F22: anterior and dorsomedial thalamic nuclei; F23: subthalamic nucleus; F24: posterior thalamus; F25: posterior cingulate cortex; F26: primary visual area and area 19; F27: cervical spinal cord (F27a, b, c); F28: thoracic spinal cord (F28a, b, c); F29: lumbar spinal cord (F29a, b, c); F30: spinal ganglia (F30a, b); F31: spinal nerve roots (F31a: anterior; F31p: posterior); F32: choroid plexus; F33: identified cranial nerves; F34: hypophysis

Hemispheric blocks

All the rest of the brain must be frozen, kept on air-tight plastic bags and stored at -80°C as numbered coronal sections from the frontal to the occipital poles. Small remaining pieces should be identified and kept on separate plastic bags at -80°C.

Avoid thawing and freezing

Other samples

Cryoprotected samples are useful for particular free-floating immunohistochemical methods and certain *in situ* hybridizations. Sections (10x10x2 mm) are fixed in 4% buffered paraformaldehyde for 24 h and then immersed in 30% saccharose until they sink (about 24 h). Then the sections are frozen and stored in appropriately labeled plastic bags at -80°C until use.

The most common regions are:

- hippocampus
- entorhinal cortex
- amygdala
- substantia nigra
- caudate
- putamen
- frontal cortex area 8.
- medulla oblongata
- pons
- spinal cord

Electron microscopic processing requires the fixation of fresh small (1mm²) blocks in 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer for 24 h, followed by washing in buffer phosphate, post-fixation in 1% osmium tetroxide, and plastic embedding. Another fixative solution is 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in cacodylate buffer or phosphate buffer.

Other biological samples

- CSF**, avoiding any contamination with blood
- serum**
- DNA**
- RNA** from peripheral blood cells

Preservation of CSF and serum is conducted by rapid freezing and storage at -80°C. DNA must be obtained by appropriate methods and stored at -80°C. RNA from peripheral blood is usually obtained after collecting peripheral blood in PAXgene Blood RNA tubes and processing the lysates for RNA extraction.

Esquema

INVESTIGACIÓN Y PATOLOGÍA MOLECULAR

- Introducción (Enrique de Álava)
- Investigación (Enrique de Álava)
- Patología Molecular Diagnóstica y Dianas Terapéuticas (Fernando López-Ríos, Santiago Montes)
- Biobancos (Manuel Morente)
- Consentimiento Informado en Investigación (Victoria Cusí)
- Oportunidades y limitaciones de las muestras de bancos de tejidos neurológicos para estudios moleculares (Isidro Ferrer)

Consentimiento informado

es un proceso de información exhaustiva al paciente para solicitarle su autorización a participar en una investigación, que culmina en un documento escrito.

Según la Ley de Investigación Biomédica: *“Consentimiento es la manifestación de la voluntad libre y consciente válidamente emitida por una persona capaz, o por su representante autorizado, precedida de la información adecuada”*

El punto clave es la información y esta información debe ser exhaustiva. De hecho la muestra se podrá utilizar únicamente para lo que ha sido autorizada

El Real Decreto en su artículo 23 establece los puntos de los que hay que informar al paciente/donante

Cuando hablamos de CI debemos diferenciar lo que es verdaderamente el CI (el proceso de CI) del documento en que se plasma

El proceso de información exige que al paciente/donante se le informe verbalmente del contenido, se responda a sus preguntas y se resuelvan las dudas que pueda presentar. Es necesario asegurarse de que ha entendido bien lo que se le ha explicado y de que está de acuerdo sin reticencias

Especificidad del consentimiento Informado:

Como principio general una muestra se puede utilizar para lo que ha sido autorizada

En un biobanco autorizado, en que todos los proyectos en que se utilizarán esas muestras necesitan la aprobación del Comité de Ética de la Investigación y las muestras están sometidas a un proceso de codificación y a controles múltiples, actualmente **se admite un consentimiento amplio para investigación**

En un **proyecto concreto** para el que se solicita un **CI específico para el proyecto** es posible que, cuando se ha finalizado el proyecto, quede un **excedente de muestra**. Si no se ha solicitado autorización para ceder la muestra a un biobanco, ese excedente debe destruirse o solicitar un nuevo consentimiento para otro proyecto.

Un CEI puede “dispensar” de solicitar un CI si se dan determinadas condiciones, especificadas en la Ley: **exención de consentimiento**

Otros puntos abordados en el capítulo

- **Problemas específicos en menores**
- **¿Por qué hay que solicitar un Consentimiento Informado? Referencias éticas**



jagmas/09

Un proceso continuo...